Aus dem Pharmakologischen Institut der
Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. M. Siess

ZUR WIRKUNG VON CARBOCROMEN AUF FUNKTION UND SUBSTRATOXIDATION DES VORHOFMYOKARDS

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

JOSEF REINHARD SAUTER
aus Meckenbeuren

1978

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. M. Siess

ZUR WIRKUNG VON CARBOCROMEN AUF FUNKTION UND SUBSTRATOXIDATION DES VORHOFMYOKARDS

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

JOSEF REINHARD SAUTER
aus Meckenbeuren

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. H. J. Mallach

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. M. Siess

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. R. Jacob

Gedruckt bei Fa. Hans-Joachim Köhler - Neue Straße 11 - 7400 Tübingen

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Methodik	6
2.1	Versuchstiere und Präparation	6
2.2.1.	Präparierkammer	8
2.2.2.	Herzvorhofhalterung	9
2.2.3.	Reizgeber	10
2.2.4.	Versuchskammer	11
2.2.5.	Versuchsaufbau	13
2.3.	Nährlösung, Substanzen	14
2.3.1.	Krebs-Henseleit-Lösung	14
2.3.2.	Herstellung der verschiedenen Inkubationsmedien	15
2.3.3.	Verwendete Substanzen	16
2.4.	Messung der Kontraktionsgrößen	17
2.4.1.	Eichung der Feder	17
2.4.2.	Registrierung der Meßgrößen	18
2.4.3.	Berechnung der Arbeit	19
2.5.	Messung der Umsatzrate der oxydierten Substrate	21
2.5.1.	Prinzip	21
2.5.2.	Ionisationskammer	22

Seite

2.5.3. Eichung unter standardisierten Bedingungen 23

2.5.4. Berechnung des Umsatzes aus der $^{14}CO_2$-Rate 25

2.5.5. Abhängigkeit der Einstellzeit der $^{14}CO_2$-Rate bei verschieden markierter Palmitinsäure 26

2.5.6. Berechnung des Sauerstoffverbrauchs 28

2.6. Versuchsauswertung 29

3. Versuchsergebnisse 31

3.1. Wirkung von Carbocromen auf die Funktion des Meerschweinchenherzvorhofes 31

3.1.1. Einfluß auf die Frequenz des spontan schlagenden Herzvorhofes 31

3.1.2. Einfluß von Carbocromen auf die Inotropie beim elektrisch gereizten Herzvorhof 37

3.2. Einfluß von Carbocromen auf den Stoffwechsel des Herzvorhofes 39

3.2.1. Wirkung auf den Stoffwechsel bei wechselseitig ^{14}C-markierter Glucose und Palmitinsäure 40

3.2.1.1. Stoffwechselverhalten von nicht vorgeschädigten Herzvorhöfen mit wechselseitig markierter Glucose und Palmitinsäure 40

Seite

3.2.1.2. Stoffwechselverhalten von hypoxisch vorgeschädigten Herzvorhöfen bei Inkubation mit wechselseitig markierter Glucose und Palmitinsäure 45

3.2.2. Wirkung auf den Stoffwechsel bei wechselseitig ^{14}C-markiertem Palmitat und Hexanoat 56

3.2.2.1. Inkubation mit 2 mM ^{14}C-Hexanoat und 0,5 mM Palmitat + 0,5% Albumin 56

3.2.2.2. Inkubation mit 0,5 mM ^{14}C-Palmitat + 0,5% Albumin und 2 mM Hexanoat 57

3.2.2.3. Sauerstoffverbrauch vor und nach Zugabe von Carbocromen 60

3.2.3. Wirkung auf den Stoffwechsel bei wechselseitig ^{14}C-markierter Glucose und Hexanoat 63

3.2.3.1. Inkubation mit 2 mM Hexanoat und 15 mM Glucose bei wechselseitiger Markierung 63

3.2.3.2. Inkubation mit 0,5 mM Hexanoat und 15 mM Glucose bei wechselseitiger ^{14}C-Markierung 65

3.2.3.3. Direkte Sauerstoffverbrauchsmessung vor und nach Carbocromen bei Inkubation mit ^{14}C-Hexanoat (2 mM) und 15 mM Glucose 69

4. Diskussion 72

		Seite
4.1.	Wirkung von Carbocromen auf die Funktion des Herzvorhofes	72
4.2.	Wirkung von Carbocromen auf den Stoffwechsel des Herzvorhofes	76
4.2.1.	Inkubation von gut versorgten Herzvorhöfen mit wechselseitig markierter Glucose und Palmitinsäure	76
4.2.2.	Inkubation mit Palmitinsäure und Hexanoat	80
4.2.3.	Inkubation mit wechselseitig markierter Glucose und Hexanoat	83
4.2.4.	Inkubation von hypoxisch vorgeschädigten Herzvorhöfen mit wechselseitig markierter Glucose und Palmitinsäure	87
5.	Zusammenfassung	94
6.	Literaturverzeichnis	98

1. Einleitung

Zur Aufrechterhaltung seiner Leistung benötigt der Herzmuskel zur Deckung seines Energiebedarfs eine intensive Versorgung mit Substraten und Sauerstoff. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Energiegewinnung praktisch ausschließlich über den aeroben Stoffwechsel durch freie Fettsäuren (bis zu 70%), Glucose (10-20%), Milchsäure (10-20%) und die nur bei Hunger und Diabetes mellitus zur Bedeutung kommenden Ketonkörper (Bing, 1967). Dieser Substratverbrauch unterliegt einem tageszeitlichen Rhythmus (Bing et al., 1954 u. 1965; Müller-Seydlitz et al., 1970; Olson, 1959). Im Nüchternzustand dominieren die freien Fettsäuren, postprandial steigt die Verwertung der Kohlenhydrate an (Bing et al., 1954).

Shipp (1964), Evans (1964), Neely et al., (1970, 1974) u.a. fanden, daß sich die freien Fettsäuren, die Glucose und die Milchsäure gegenseitig in Abhängigkeit von der Konzentration im arteriellen Blut als Substrate vertreten können. Keul und Reindell beobachteten 1965 an Hochleistungssportlern, daß bei Leistungssteigerung das menschliche Herz bevorzugt Lactat verbrennt, und die Fettsäureoxidation zurückgedrängt wird. Da dem Herz also ein reiches Substratangebot zur Verfügung steht, betreffen Versorgungsstörungen in erster Linie den Sauerstofftransport.

Störungen im Energiestoffwechsel des Herzmuskels

kommen daher fast ausschließlich bei Auftreten eines Mißverhältnisses zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot meist lokal hinter Stenosen zustande. Hier liegen auch die therapeutischen Ansätze.

Eine Möglichkeit zur Behebung des Mißverhältnisses besteht in der Erhöhung der Sauerstoffzufuhr durch Substanzen mit einer spezifischen Wirkung auf die vasale Komponente des Koronarwiderstandes. Eine dieser Anfang der sechziger Jahre als sog. Koronardilatatoren auf den Markt gekommenen Substanzen ist das Carbocromen (Intensain®).

Die zunächst tierexperimentell nachgewiesene spez. Steigerung der Koronardurchblutung (Nitz u. Pötzsch, 1963; Lochner u. Hirche, 1963; Bretschneider et al., 1963) konnte später klinisch experimentell bestätigt werden (Hilger et al., 1968, 1971; Rudolph et al., 1967). Hilger und auch Rudolph stellten mittels Herzkatheter am Menschen nach Carbocromen eine Zunahme der koronarvenösen Sauerstoffsättigung und eine Abnahme der arterio - koronarvenösen Sauerstoffdifferenz fest. Heistracher u.a. (1964) stellten tierexperimentell bei einer Reihe von sog. Koronardilatatoren, u.a. beim Carbocromen eine Zunahme der Koronardurchblutung für die Dauer von bis zu 2 Stunden fest, während die Wirkung der bis dahin bekannten gefäßerweiternden Präparate Papaverin und Diphenyl-propyl-amin nur wenige Minuten anhielt (Kochsiek et al., 1960).

Trotz der experimentell nachgewiesenen Verbesserung des Verhältnisses von O_2-Angebot und O_2-Verbrauch ergab die klinische Austestung dieser Koronardilatatoren weder bei oraler noch bei parenteraler Anwendung eine therapeutische Wirksamkeit beim Angina-pectoris-Anfall. Dies liegt wohl an einem ähnlichen Wirkungsmechanismus und Angriffspunkt sowohl der Koronardilatatoren, als auch der Autoregulation der Koronararterien. Bei Durchblutungsstörungen, die ja vor allem im endokardnahen Gebieten auftreten, schöpft die an der vasalen Komponente angreifende Autoregulation die Koronarreserve voll aus, so daß ein zusätzlicher pharmakodynamischer Effekt nicht mehr möglich ist. Durch die Gabe von Koronardilatatoren kann es darüberhinaus sogar zu einer Abnahme der Durchblutung im gefährdeten poststenotischen, subendokardialen Gebiet kommen (koronares "Steal-Phänomen").

Für die therapeutische Wirksamkeit eines dieser Koronardilatatoren (Carbocromen) bei der Intervalltherapie der Angina pectoris sprechen dagegen umfangreiche gekreuzte Doppelblindstudien mit Patienten, welche an koronarer Herzkrankheit leiden (Schvacabaja u.a., 1970; Bing u.a., 1976). Es ergaben sich hochsignifikante Besserungsraten nach Carbocromen.

Nachdem sich diese klinischen Befunde schlecht mit der Koronardilatation erklären ließen, wurden auch andere

Wirkungsmechanismen zur Diskussion gestellt.

So fanden Nitz und Resag (1966) im Tierexperiment nach langfristiger Gabe von Carbocromen die Ausbildung eines gegenüber den Kontrollen stärker ausgeprägten Koronargefäßnetzes mit Kaliberzunahme präformierter Kollateralen.

Weitere Untersuchungen ließen vermuten, daß auch metabolische Wirkungen von Carbocromen eine entscheidende Bedeutung haben. So fand Möllmann et al. (1972) im Bereich der Mitochondrien eine Anreicherung von Carbocromen. Weitere Arbeiten deuteten auf eine Hemmung der Phosphodiesterase (Schraven u. Nitz, 1968; Pöch und Kukovetz, 1972) und einen Anstieg von cAMP im Herz nach enteraler und parenteraler Applikation von Carbocromen (Schraven et al., 1976) hin.

Den eigentlichen Anstoß zu der vorliegenden Arbeit gab die Arbeit von Schraven (1976) über die "Regulation des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels des Herzens durch Carbocromen". In dieser Arbeit wurde eine dosisabhängige Hemmung des Einbaus von ^{14}C-Palmitinsäure in Rattenherzschnitte bis zu 30%, eine Erhöhung der Aufnahme von ^{14}C-3-O-Methyl-D-glucose um 30% und eine Reduzierung des Abbaus von ^{14}C-Palmitinsäure zu $^{14}CO_2$ bis zu 40% beschrieben.

Die weitere Schlußfolgerung war eine Senkung des

Sauerstoffbedarfs: "Durch die stärkere Verwertung der Glucose zu Lasten der FFS kommt es zu einer besseren Sauerstoffausnutzung, da Glucose ein höheres kalorisches Äquivalent für den Muskel darstellt als Fettsäuren. Von Mjos u.a. (1972) wird dieser Effekt auch als "oxygen wasting effect of free fatty acids" bezeichnet. Die Versuchsergebnisse obiger Arbeit sind zum großen Teil aus Experimenten mit Rattenherzschnitten entstanden.

Nachdem in den letzten Jahren (Siess et al., 1970) mit einer speziell entwickelten Methode am isolierten Herzvorhof die Kinetik der Oxidationsrate verschiedener Substrate des Energiestoffwechsel von Kohlenhydraten und kurzkettigen Fettsäuren untersucht werden konnte (Siess et al. 1970; Siess M., 1976) und Süßkand (1976) nach einer Änderung in der Methodik auch die Untersuchung der Kinetik langkettiger Fettsäuren durchführte, prüften wir eventuelle Verschiebungen in der Oxidation von Kohlenhydraten und Fettsäuren zusammen mit der bisher nicht untersuchten Wirkung von Carbocromen auf die Funktion des Herzmuskels.

2. Methodik

2.1. Versuchstiere und Präparation

Für die Versuche wurden junge männliche Meerschweinchen mit einem Lebendgewicht zwischen 167 g und 269 g (mittleres Gewicht 216 ± 2,57 n=74) verwendet. Sie erhielten neben Trockenfutter der Firma Altromin (Lage/Lippe) Grünfutter und Karotten. Trinkwasser wurde in Saugflaschen ad libitum geboten. Die linken Herzvorhöfe hatten ein mittleres Feuchtgewicht von 22,4 mg und die mittlere Streuung des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) betrug 0,31 mg (n=65).

Nachdem die Tiere gewogen waren, wurden sie mit Hilfe eines Bolzenschußgerätes durch Gehirnschuß getötet und auf ein Präparierbrett aufgespannt. Das Fell wurde nach einem Medianschnitt bis zum Jugulum nach beiden Seiten abpräpariert. Die Arteria brachialis wurde zum Ausbluten durchtrennt. Dann wurde die Bauchdecke median bis zum Processus xyphoideus aufgeschnitten und nach links und rechts entlang den Rippenbögen abgetrennt. Die Pleurahöhle wurde eröffnet und das Zwerchfell abgelöst. Nach Ablösung des Pericards von der Sternumrückseite wurden die Rippen beider Seiten in der Medioclavicularlinie durchtrennt, so daß die Thoraxvorderwand abgehoben werden konnte. Der Herzbeutel wurde eröffnet und die Herzspitze abge-

trennt. Das Herz wurde mit der Pinzette am verbleibenden linken Ventrikelmyokard erfaßt, angehoben und dicht über den beiden Vorhöfen abgeschnitten. Das Präparat wurde sofort in einer Petrischale, die mit zimmerwarmer, carbogengesättigter Krebs-Henseleit-Lösung gefüllt war, blutleer gespült. Die eigentliche Präparation erfolgte in einer von Mensing, Pharmakologisches Institut der Universität Tübingen entworfenen und von Herrn Glasinstrumentenmachermeister Jung angefertigten Präparierkammer. Hier wurde in carbogendurchperlter, glucosehaltiger (14 mM) Krebs-Henseleit-Lösung mit einer Temperatur von 30° C Pericard, Ventrikelmyocard, Aorta, Art. pulmonales und die Vena cava inferior, sowie Fett- und Bindegewebe sorgfältig entfernt. Bei dem spontanschlagendem ganzen Vorhofpräparat wurde darauf geachtet, daß die Vena cava superior bis auf einen ca. halbmillimeterlangen Stumpf stehen blieb, um den Sinusknoten nicht zu beschädigen. Bei der Präparation der hauptsächlich verwendeten elektrisch stimulierten linken Vorhöfen wurde nun der rechte Vorhof abgetrennt. Während der Einarbeitung in die Präparationsmethode zeigte es sich, daß die besten Ergebnisse in Bezug auf Kontraktionsamplitude und Rhythmusstörungen erreicht wurden, wenn vom li. Vorhof der Bereich entfernt wurde, in welchen die Lungenvenen einmünden. Dieser Bereich nimmt an der Kontraktionsarbeit

des Vorhofes nur in geringem Umfang teil.

Da die Vorhofpräparate während des Versuchs nicht vasculär perfundiert werden, mußte darauf geachtet werden, daß der Diffusionsweg zu den im Inneren des Präparats gelegenen Zellen möglichst kurz gehalten wurde (Röger, 1970). Dies wurde einmal durch Auswahl nicht zu großer Tiere erreicht. Zum anderen wurde die Präparation so ausgeführt, daß eine gute Versorgung auch vom Vorhoflumen her gewährleistet wurde: Die Mitralklappen am linken Vorhof wurden sorgfältig entfernt und das Ostium zum Vorhoflumen evtl. noch erweitert.

Nach Beendigung der Präparation wurde der linke Vorhof in einer Plexiglashalterung fixiert. Der distale Teil des Vorhofes wurde in den unteren Teil der Muskelhalterung eingespannt, während der proximale Teil an einer Klammer aus Silberdraht befestigt wurde, so daß das Präparat in der Richtung des Hauptfaserverlaufes gestreckt wurde.

2.2.1. Präparierkammer

Um die Schädigung des Herzvorhofes durch Hypoxie während der Präparation möglichst gering zu halten, wurde von Herrn Dr. Mensing eine spezielle Präparierkammer entworfen und von Herrn Glasinstrumentenmachermeister Jung, Marburg, gefertigt. Das Gefäß enthält in

einem gemeinsamen Wassermantel zur Thermostatisierung eine Präparier- und eine Gasaustauschkammer, Beide sind oben und unten über zwei gleichgerichtete schräge Glasröhrchen miteinander verbunden. Durch die in der Gasaustauschkammer den Boden bildene G3-Fritte steigen Gasbläschen hoch und reißen die Nährlösung mit nach oben, wodurch ein Sog entsteht. Dieser bewirkt im unteren Verbindungsröhrchen einen Flüssigkeitsstrom von der Präparierkammer in die Gasaustauschkammer und im oberen Verbindungsröhrchen einen entsprechend umgekehrten Flüssigkeitsstrom. Der Boden der Präparierkammer wird von einer mit ca. 10 Löchern (d 1 mm) perforierten Glasplatte gebildet. Das untere Verbindungsröhrchen mündet unterhalb, das obere oberhalb der Bodenplatte. Auf diese Weise ist ein fortwährender Umlauf und Oxygenierung der Nährflüssigkeit in der Präparierkammer gewährleistet.

2.2.2. Herzvorhofhalterung

Die Kontraktionen des in die Muskelhalterung eingespannten Vorhofs werden über einen Rollenmechanismus nach außen zum Wegnehmer übertragen. Der von der Serrefine kommende Faden liegt auf einer Rolle, dessen Achse in 2 Teflonringen gelagert ist. Zur Abdichtung der Achsführung nach außen dient eine am Achsenaustritt ange-

flanschte 12 mm lange Plexiglashülle, die durch eine mit einer die Achse aufnehmenden zentralen Bohrung versehenen Endplatte abgeschlossen und mit Öl gefüllt ist. Über eine zweite Rolle des gleichen Durchmessers erfolgt die Übertragung der Kontraktionen mittels eines Fadens auf eine Blattfeder. Die elektrischen Impulse werden durch zwei am unteren Teil der Klemmvorrichtung im Abstand von ca. zwei mm angebrachten Platinelektroden auf den Vorhof übertragen. Die Herzvorhofhalterung wurde von Herrn K. Stieler, Biotechniker am Pharmakologischen Institut, entworfen und gefertigt.

2.2.3. Reizgeber

Die Auslösung der elektrischen Impulse erfolgte durch ein Reizgebergerät. Dieses erzeugt elektrische Rechteckströme. Die Impulslänge, die Stromstärke und die Frequenz der elektrischen Reizungen sind am Gerät einstellbar. Eine Kontrolle der erfolgten Impulse ist durch akustische und optische Signale möglich. Bei unseren Versuchen wurde mit einer Stromstärke von 1,4 mA - 1,9 mA und einer Impulslänge von 0,7 msec - 1 msec gearbeitet.

2.2.4. Versuchskammer

Wegen der Verwendung von Palmitinsäure mit der Neigung zu starker Schaumbildung bei direkter Gasdurchperlung wurde die bei Süßkand (1976) beschriebene, von Herrn Dr. Mensing konstruierte und von Herrn Glasinstrumentenmachermeister Jung, Marburg, gefertigte Glasapparatur benützt (Abb. 1). Sie besteht aus einer Muskel- und Gasaustauschkammer, welche von einem Wassermantel umgeben sind. In der Gasaustauschkammer rinnt die Nährlösung als dünner Flüssigkeitsfilm an der Glaswandung herab, während der Gasstrom der Flüssigkeit entgegen nach oben streicht. Die frisch oxygenierte Lösung wird durch eine Pumpe in die 10 cm höher gelegene Muskelkammer gefördert. Von hier gelangt die Flüssigkeit nach dem Prinzip der kommunizierenden Röhren wieder in den Oxygenator. Als Pumpe kam die von unserer Arbeitsgruppe (Siess et al., 1970) schon früher benutzte, durch Mensing modifizierte und bei Süßkand (1976) beschriebene Ganzglaskolbenpumpe zur Verwendung.

Da das Füllvolumen der zusammengesetzten Apparatur nur 9 bis 10 ml betrug und das Pumpenminutenvolumen mit 49 ml/min relativ groß war, war ein rascher Gasaustausch und eine konstante Temperatur gewährleistet.

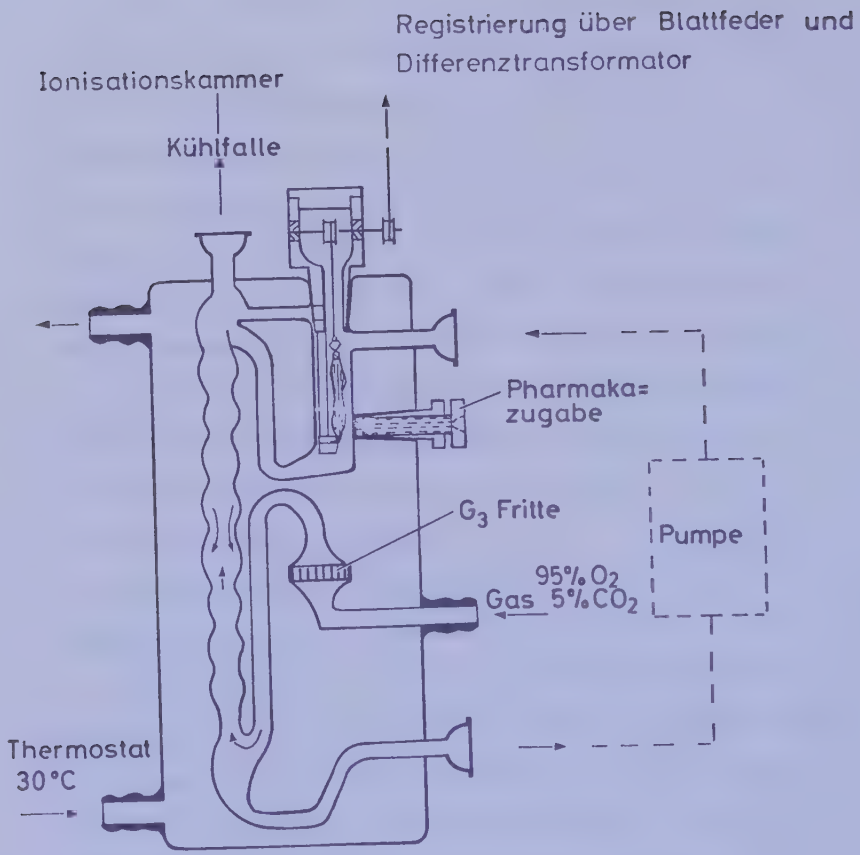


Abb.: 1 Versuchskammer (nach Süßkand, 1976)

2.2.5. Versuchsaufbau

a. Prinzip

Das in der beschriebenen Muskelhalterung fixierte Vorhofpräparat wird in die Muskelkammer eingebracht und unter eine Spannung von 500 mg gesetzt. Die Aktion des Herzvorhofes wird außerhalb der Kammer auf eine geeichte Feder mit linearem Wegaufnehmer übertragen und als systolische und diastolische Spannungswerte auf 2 getrennte Kanäle eines Mehrkanalschreibers (Rikadenki) registriert. Über einen Ratemeter wird die Frequenz auf einem weiteren Kanal laufend festgehalten. In der Oxygenatorkammer wird die Nährlösung mit Carbogen (95% O_2, 5% CO_2) mittels eines Durchflußreglers mit 2 l/h Gasgemisch konstant oxygeniert. Das im Herzmuskel durch Verbrennung ^{14}C-markierter Substrate entstehende und in die Nährlösung abgegebene $^{14}CO_2$ wird hier gleichzeitig mit dem im Oberschuß vorbeiströmenden inaktiven CO_2 ausgetauscht und im konstanten Gasstrom mitgerissen. In einer nachgeschaltenen Kühlfalle, welche mit einem Methanol-Wasser-Gemisch von $-3^{o}C$ durchströmt wird, kommt es zu einer Elimination des Wasserdampfes. Das getrocknete Gasgemisch gelangt anschließend in eine hochempfindliche Ionisationskammer. Eine Änderung der Ionisierung in der Kammer durch zerfallende ^{14}C-Atome

wird in der Änderung des Ionisationsstromes auf ein Vibrating-Reed-Elektrometer (Cary) übertragen und auf einem weiteren Kanal registriert. Hinter der Ionisationskammer befindet sich wieder ein Flowmeter zur Überprüfung konstanter Druck - und Strömungsverhältnisse und eine KOH-Falle für das austretende $^{14}CO_2$.

2.3. Nährlösung, Substanzen

2.3.1. Krebs-Henseleit-Lösung

Wir verwendeten die Krebs-Henseleit-Lösung nach der Originalbeschreibung von 1932 in folgender Zusammensetzung (alle Substanzen "Merck" p. a.):

Na^+	327	mg/100 ml	≙	142	mM
K^+	23	mg/100 ml	≙	5,9	mM
Ca^{++}	10	mg/100 ml	≙	2,5	mM
Mg^{++}	2,9	mg/100 ml	≙	1,5	mM
Cl^-	454	mg/100 ml	≙	128	mM
PO_4^{3-}	11	mg/100 ml	≙	1,2	mM
SO_4^{2-}	11,4	mg/100 ml	≙	1,2	mM
HCO_3^-	54	Vol.%	≙	24	mM
5% CO_2- 95% O_2-Sättigung			≙	pH 7,4	

2.3.2. Herstellung der verschiedenen Inkubationsmedien

Von der angegebenen Krebs-Henseleit-Lösung als Basis wurden unter rechnerischer Berücksichtigung der Molarität und bei markierten Substanzen der spezifischen Aktivität nachfolgende Lösungen zusammengestellt.

1. 15 mM Glucose
2. 15 mM Glucose + 0,5 mM ^{14}C-Hexanoat
   (spez. Akt. 1 uCi / 5 uMol)
3. 15 mM Glucose + 2 mM ^{14}C-Hexanoat
   (spez. Akt. 1 uCi / 5 uMol)
4. 15 mM Glucose + 0,5 mM ^{14}C - U - Palm. - 0,5 % Alb.
   (spez. Akt. 1 uCi / 1 uMol)
5. 15 mM Glucose + 0,5 mM ^{14}C - 1 - Palm. - 0,5 % Alb.
   (spez. Akt. 1 uCi / 1 uMol)
6. 15 mM ^{14}C - U - Glucose + 0,5 mM Hexanoat
   (spez. Akt. 1 uCi / 10 uMol)
7. 15 mM ^{14}C - U - Glucose + 2 mM Hexanoat
   (spez. Akt. 1 uCi / 10 uMol)
8. 15 mM ^{14}C - U - Glucose + 0,5 mM Palm. - 0,5 % Alb.
   (spez. Akt. 1 uCi / 10 uMol)
9. 0,5 mM Palm - 0,5 % Alb. + 2 mM ^{14}C - Hexanoat
   (spez. Akt. 1 uCi / 5 uMol)
10. 0,5 mM ^{14}C - U - Palm. - 0,5 % Alb. + 2 mM Hexanoat
    (spez. Akt. 1 uCi / 1 uMol)

Die Herstellung der Inkubationsmedien mit Glucose und Hexanoat war relativ einfach, da beide Substanzen gut wasserlöslich sind. Schwieriger war die Herstellung von Nährmedien mit der nur schwach wasserlöslichen Palmitinsäure. Hier wurde die von der Arbeitsgruppe um Shipp (1963) publizierte und von Süßkand (1976) modifizierte Methode angewandt, Palmitinsäure an Albumin gebunden in Wasser zu lösen. Hierbei wurde das elektrophoretisch gereinigte Serumalbumin vom Rind der Behringwerke Marburg verwendet. Nach Untersuchungen von Süßkand (1976) enthält der Komplex von 1 mM Palmitinsäure - 1 % Albumin durch dessen Verunreinigung einen bis zu 20% höheren Gehalt an Fettsäuren, womit die spezifische Aktivität der ^{14}C-Palmitinsäure entsprechend verschoben wird. Dies wirkt sich als ein Fehler in derselben Höhe auf die Umsatzangaben aus, die tatsächlich 10 bis 20 % höher anzusetzen sind, als im Folgenden angegeben ist.

2.3.3. Verwendete Substanzen

Albumin vom Rind	Behring
Carbocromenhydrochlorid (Intensain®)	Casella*
Glucose	Merck
Hexansäure	Merck
Palmitinsäure	Merck

---

* Wir danken der Firma für die Verfügungstellung von Ampullen.

Radioaktive Substanzen: Radiochemical Centre Amersham U. K.

Glucose-D-^{14}C	CFB	2	Batch 182	3	mCi/mMol
			Batch 206	2,9	mCi/mMol
Hexanoic acid-1-^{14}C	CFA	118	Batch 13	31,5	mCi/mMol
Palmitic acid-1-^{14}C	CFA	23	Batch 77	56	mCi/mMol
Palmitic acid-U-^{14}C	CFB	37	Batch 20	237	mCi/mMol
Na_2 $^{14}CO_3$	CFA	2	Batch 144	58	mCi/mMol

2.4. Messung der Kontraktionsgrößen

2.4.1. Eichung der Feder

Ober die beschriebene Muskelhalterung wurden Erschlaffung und Kontraktion der Herzvorhöfe durch Rollen, deren Achsen in Mikrokugellagern gelagert sind, im Verhältnis 1 : 1 aus dem Inneren des Systems nach außen auf eine Blattfeder übertragen. Die Federkonstante war zur Berechnung der geleisteten Arbeit des Herzvorhofs auf folgende Weise bestimmt worden: Die Feder wurde mit geeichten Gewichten belastet. Die relativ kleine Auslenkung der Blattfeder wurde im Bereich von 500 - 2000 mg auf 1/10 mm genau gemessen. Es zeigte sich eine lineare Beziehung zwischen Auslenkung und angewendeter Spannung der Feder. Die Federlänge wurde so eingestellt,

daß bei einer Belastung von 1000 mg die Feder um 1 mm ausgelenkt wurde. Dieser Wert liegt den späteren Berechnungen zugrunde. Der Weg, der durch die Auslenkung der Feder in senkrechter Richtung zurückgelegt wurde, wurde über einen Weicheisenkern, der in einen induktiven Wegaufnehmer ragte, aufgenommen. Dabei wurde die elektromagnetische Kopplung zwischen drei als Transformatoren geschaltenen Spulen verändert. Die Ausgangsspannung der Spulen folgte linear der Auslenkung des Kernes. Für einen Nennmeßbereich von ± 2,5 mm von der Nullage aus garantierte der Hersteller eine Abweichung der Ausgangsspannung von der Linearität um ± 1 %.

2.4.2. Registrierung der Meßgrößen

Die Spannungsschwankungen, welche am Wegaufnehmer erzeugt und auf ein Spitzenwertmeßgerät übertragen wurden, kamen auf einem 6-Kanal-Kompensationsschreiber (Rikadenki, Japan) zur Aufzeichnung. Das Spitzenwertmeßgerät integrierte die Extremwerte der wegproportionalen Spannung durch getrennte Aufnahme und machte somit die diastolische und systolische Auslenkung einer getrennten Registrierung zugänglich. Die Impulse der Spannungsschwankungen wurden auf ein Ratemeter übertragen. Das Prinzip dieses Ratemeters beruht darauf, daß

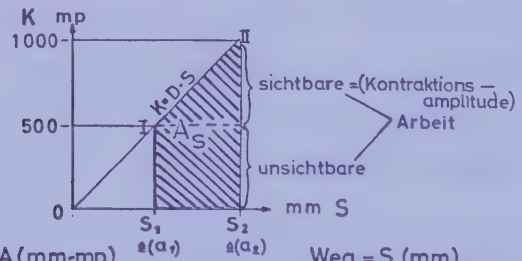
eine Spannung erzeugt wird, die umgekehrt proportional dem Zeitintervall zweier aufeinanderfolgender Impulse ist. Es mißt daher Änderungen der Zeitspanne zwischen zwei Impulsen. Nach Eintreffen eines Impulses werden innerhalb einer bestimmten Zeitspanne ankommende neue Impulse nicht registriert, so daß etwaige kleine Nachschwingungen der Feder nicht aufgenommen werden. Diese Zeitspanne entspricht mit ca. 0,2 Sekunden der Dauer einer Kontraktion mit Erschlaffung, so daß im oberen Grenzbereich noch Frequenzen bis zu 250 Impulsen/min aufgezeichnet werden können. In einer Eichmessung wurde mittels eines eingebauten Potentiometers die Ausgangsspannung so eingestellt, daß bestimmte Frequenzen mit Markierungen auf dem Schreiberpapier übereinstimmen. Durch optische Anzeige ist jederzeit eine Oberprüfung der Frequenz möglich.

2.4.3. Berechnung der Arbeit

Die registrierte Arbeit gegen eine Feder ist hinsichtlich der Spannungs- und Wegverhältnisse mit der Arbeit des Herzmuskel in vivo vergleichbar. Bei der Kontraktion kommt es in vivo in der Kammer zunächst unter sehr geringer Verkürzung des Muskels gegen stark ansteigenden Druck - ähnlich dem zunehmenden Widerstand der Feder - zur isometrischen Span-

nungszunahme. Zu einer starken Verkürzung der Kammermuskulatur kommt es in der Austreibungsphase, wenn der Ventrikeldruck den diastolischen Aortendruck übersteigt, sich die Semilunarklappen öffnen und der Kammerinhalt bei weiter ansteigendem Druck ausgeworfen wird. Die Kontraktion des Herzmuskelpräparates in vitro verläuft in folgender Weise: Es wird eine Spannung, hier 0,5 g, vorgegeben und während des Versuches konstant gehalten (Vorspannung ≙ Diastole). Bei der Kontraktion erhöht sich die Spannung mit zunehmender Auslenkung der Feder. Aus der Vorspannung, der Auslenkung und der sich während der Auslenkung erhöhenden Spannung ergibt sich die Arbeit des Herzvorhofes pro Schlag.

Berechnung der Arbeit durch Bewegung einer Feder



Arbeit = A (mm-mp) Weg = S (mm)

Kraft = K (mp) Federkonstante = D (mp/mm)

$A = K \cdot S \qquad K = D \cdot S \qquad D = \frac{1000\ mp}{2\ mm}$

$$A = \int_{S_1}^{S_2} D \cdot S \cdot ds = \frac{1}{2} D \cdot S^2 \Big|_{S_1}^{S_2} = \frac{1}{2} D (S_2^2 - S_1^2)$$

A_S = Fläche $(S_1 I II S_2)$

= Fläche $\Delta(0\text{-}II\text{-}S_2) - \Delta(0\text{-}I\text{-}S_1)$

Umrechnung über den Schreiber mittels des induktiven Wegaufnehmers

f = Schreiberfaktor a = Schreiberauslenkung

$$A_S = \frac{500}{2 \cdot 50 \cdot 50} (a_2^2 - a_1^2) = 0{,}1\ (a_2^2 - a_1^2)\ \text{mm} \cdot \text{mp}$$

Die durch die Beschleunigung der Federmasse ($\frac{m}{2} v^2$) bedingte zusätzliche Arbeit liegt nach früheren Berechnungen unter 1 % der normalen Kontraktionsarbeit pro Schlag und wurde daher vernachlässigt. Der linke Herzvorhof wird in seinem größten diagonalen Durchmesser aufgehängt, so daß bei der Belastung hauptsächlich die Herzmuskelfasern, die in dieser Richtung liegen, für die meßbare Kontraktionsarbeit herangezogen werden. Diese Arbeit wird als Vektor registriert. Die optimale Herzleistung hängt daher außer von der Präparation auch von der Befestigung der Präparate im System ab und ist somit relativ. Am gleichen Präparat können Änderungen der Leistung aber berechnet und verglichen werden.

Die Kontraktionsleistung ergibt sich aus der Kontraktionsarbeit pro Schlag, der Frequenz und der Zeit:
$P_h = A_s \cdot f \cdot 60$ cm p/h. (mN·mm/h).
(1 p = 9,80665 mN; 10 mN = 1,019 p). In den folgenden Tabellen wurden die alten Bezeichnungen gewählt.

2.5. Messung der Umsatzrate der oxydierten Substrate

2.5.1. Prinzip

In der vorher beschriebenen Oxygenatorkammer wird die Nährlösung mit 2 l/h (33,33 ml/min) Gasgemisch

(Carbogen) konstant durchperlt. Das im Herzmuskel durch Verbrennung ^{14}C-markierter Substrate entstandene und in die Nährlösung abgegebene $^{14}CO_2$ wird mit dem im großen Überschuß durchperlten inaktiven CO_2 ausgetauscht und im konstanten Gasstrom mitgeführt. Nach Trocknung in einer nachgeschaltenen Kühlfalle, welche aus einem Kühlaggregat der Firma Lauda mit einem Methanol-Wassergemisch von $-2^{o}C$ gespeist wurde, gelangt das Gasgemisch in eine hochempfindliche Ionisationskammer. Eine Änderung der Ionisierung in der Kammer durch zerfallende ^{14}C-Atome wird in der Änderung des Ionisationsstromes an einem Vibrating-Reed-Elektrometer (Cary) registriert und auf einen Schreiber übertragen.

2.5.2. Ionisationskammer

Die Ionisationskammer hat ein Volumen von 100 ml. An die Pole wurde eine konstante Spannung von 90 V angelegt, am Vorverstärker die höchste Empfindlichkeitsstufe von $1,4 \cdot 10^{-12}$ Ohm und am Vibrating-Reed-Elektrometer (Cary, Monrovia/Calif.) der Empfindlichkeitsbereich des Hauptverstärkers auf 10 mV eingestellt. Nach Einstellen des Untergrundes auf 0 erfolgte die Übertragung der Ausschläge auf einen Kanal des Kompensationsschreibers (Rikadenki).

2.5.3. Eichung unter standardisierten Bedingungen

Die Eichung wurde, wie auch die Versuche, unter folgenden Bedingungen durchgeführt:
10 ml K-H-Lösung mit einer Palmitinsäurekonzentration von 0,5 mM bei 0,5 % Albumin;
Pumpenminutenvolumen 50 ml/min;
Temperatur 30°C; Kühlfallentemperatur -3°C;
Carbogenstrom 33,3 ml/min bei einem Druck von 40 mm WS
Cary 10 mV; Rikadenki 10 V;
Papiervorschub 120 mm/h;

In dieses System wurden aufsteigende und abfallende Mengen Standard - $Na_2{}^{14}CO_3$ injiziert. Nach einer durch den Totraum bedingten Latenzzeit kam es zu einem Anstieg des Ionisationsstromes, der nach 7 Minuten sein Maximum erreichte und dann mit Abfluten des $^{14}CO_2$ nach ca. 1 1/2 Stunden sich wieder dem Nullpunkt näherte (Abb. 2).

Die Flächen unter diesen Eichkurven wurden planimetrisch gemessen und gegen die eingegebene $^{14}CO_2$-Aktivität aufgetragen. Es ergab sich eine lineare Eichkurve durch den Nullpunkt (Abb. 3). Aus dieser Eichgeraden wurde folgende Beziehung entnommen:
100 cm^2 = 16,26 nCi; 1 nCi = 6,15 cm^2

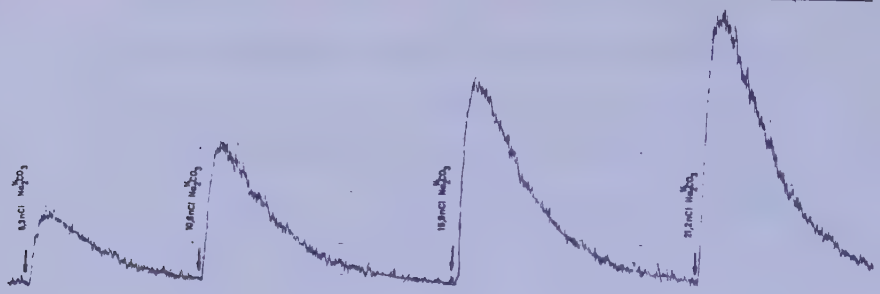


Abb.: 2 Originalregistrierung einiger Eichkurven

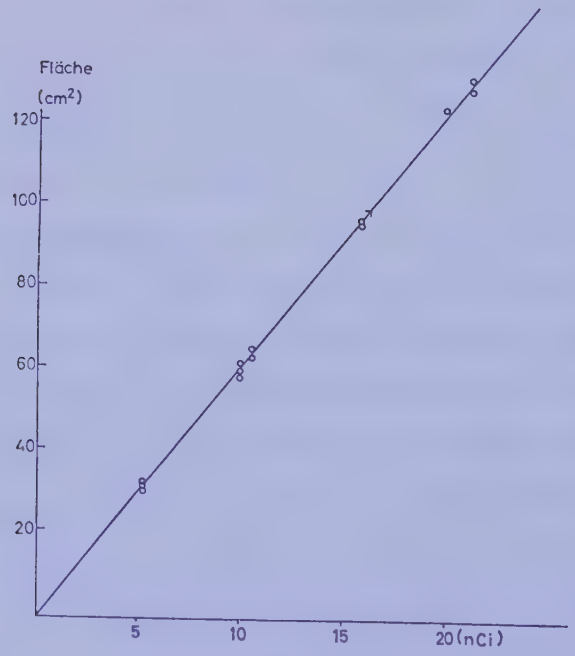


Abb.: 3 Abhängigkeit der Fläche der umschriebenen Eichkurven von der eingegebenen Aktivität

2.5.4. Berechnung des Umsatzes aus der $^{14}CO_2$-Rate

Aus der aus der Eichkurve entnommenen Beziehung läßt sich bei bekannter spezifischen Aktivität der untersuchten Substanz (Glucose, Hexanoat, Palmitinsäure) bestimmen, wieviel exogenes Substrat in der Zeiteinheit oxidiert wurde.

Bei einer Papiergeschwindigkeit des Schreibers von 12 cm/h und einem Abstand des Schreibers vom Nullpunkt von 1 cm wäre die darunter beschriebene Fläche 1 cm · 12 = 12 cm². 1 cm Schreiberausschlag entspricht daher 1,95 nCi $^{14}CO_2$/h. Bei einer spezifischen Aktivität von 1 uCi ^{14}C zu 1 uMol Palmitinsäure ergibt dies eine Oxidationsrate von 1,95 nMol Palmitinsäure in der Stunde pro 1 cm Schreiberausschlag.

Die Menge des umgesetzten Substrates ergibt sich danach aus der Gleichung:

$$O_x = 1{,}95 \left(\text{nCi/h} \cdot \frac{1}{\text{spez. Akt.}} \left(\frac{\text{nMol}}{\text{nCi}}\right) \cdot y \text{ (cm)}\right.$$

O_x = Oxidationsrate aus x nMol Palmitinsäure pro Stunde und Vorhof (Oxidationsrate)

y = Schreiberabstand von Nullinie in cm

Hierbei wird der nicht markierte endogene Substratanteil an der Verbrennung aus Glykogen und Fett nicht erfaßt. Bei ^{14}C-Glucose wird nicht die Menge bestimmt, die in Glykogen eingebaut wird oder evtl. zur Fettsynthese

herangezogen wird.

Über den Weg, den das Substrat zu $^{14}CO_2$ als Endprodukt nimmt (Pentosephosphatweg, Pyruvatdecarboxylierung, Krebscyclus), kann also keine Aussage gemacht werden. Bei uniform markierter Fettsäure wird der gesamte Abbauweg aller C-Atome erfaßt, während bei der C - 1 - markierten Fettsäuren nur der Eintritt in die erste Decarboxylierungsstufe registriert wird.

2.5.5. Abhängigkeit der Einstellzeit der $^{14}CO_2$-Rate bei verschieden markierter Palmitinsäure

Bei unseren Versuchen mit markierter Palmitinsäure stellten wir fest, daß die Zeitspanne vom Einsetzen des Vorhofs in die Versuchskammer bis zur Erreichung des Gleichgewicht in der $^{14}CO_2$-Rate von der Markierungsart der Palmitinsäure abhängig war. Um diesen Sachverhalt zu klären, bestimmten wir die Zeit vom Einsetzen des Vorhofs bis zum Erreichen des halbmaximalen Umsatzes bei ^{14}C-U-Palmitinsäure und ^{14}C-1-Palmitinsäure. Hierbei ergab sich bei in Leistung und Gesamtumsatz vergleichbaren Vorhöfen, daß die Zeit bis zur Erreichung von 50% der $^{14}CO_2$-Rate im steady-state bei C-U-markierter Palmitinsäure um ca. 30% über der Zeit bei C-1-markierter Palmitinsäure lag. Bei ^{14}C-1-Palmitinsäure betrug die Zeit bis zur Erreichung

der halbmaximalen $^{14}CO_2$-Rate 42,8 min. ± 2,2 (n=10), bei ^{14}C-U-Palmitinsäure 64,2 min ± 3,8 (n=6). Der Unterschied war mit einem $p < 0{,}001$ hoch signifikant. Dagegen war bei gleicher spezifischer Aktivität die erreichte Umsatzrate im steady state in Abhängigkeit von der Leistung die gleiche (Tabelle 1). Die verlängerte Einstellzeit von C-U-Palmitinsäure hängt sicherlich mit der Erfassung des Gesamtoxidationsablaufs in der C-16-Kette zusammen (Ballard et al., 1960; Stumpf, 1965), während bei C-1-Palmitinsäure nur der 1. Schritt der Oxidation erfaßt wird.

Tab. 1

^{14}C-Substrat	P_h (p•cm/h)	Umsatz des ^{14}C-Substrates (n Mol/h•100 mg F.G.)	Einstellzeit (min)
^{14}C-1-Palm n = 10	241 ± 26	77,3 ± 9,9	43 ± 2
^{14}C-U-Palm n = 6	260 ± 27	67,4 ± 8,5	64 ± 4 $p < 0{,}001$

2.5.6. Berechnung des Sauerstoffverbrauchs

Der Sauerstoffverbrauch der verschiedenen Substrate ergibt sich stöchiometrisch aus der jeweiligen Summenformel und der für die Oxidation benötigten Menge O_2 durch Multiplizieren der Decarboxylierungsrate des umgesetzten Substrates mit dem jeweiligen O_2-Faktor:

Glucose: $C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$

Hexanoat: $C_6H_{12}O_2 + 8\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$

Palmitinsäure: $C_{16}H_{12}O_2 + 23\ O_2 \rightarrow 16\ CO_2 + 16\ H_2O$

Dieser Sauerstoffverbrauch bezieht sich natürlich nur auf das exogen zugeführte, markierte Substrat.

Bei der Fragestellung, ob durch eine bestimmte Substanz eine Verschiebung in der Verbrennung von einem Substrat zu einem anderen und hierdurch evtl. eine Änderung im Sauerstoffverbrauch eintritt, bedienten wir uns der Methode der wechselseitigen Markierung. Die Nährmedien wurden jeweils aus zwei Substraten, einem ^{14}C-markierten und einem unmarkierten, hergestellt. In einer zweiten Versuchsreihe wurde jeweils das bisher unmarkierte als markiertes Substrat und umgekehrt zugegeben (siehe 2.3.2.). Durch Addition des aus den Umsatzraten errechneten Sauerstoffverbrauchs der 2 Substrate jeweils vor und nach Zugabe einer Substanz läßt sich eine Änderung des Gesamt-

sauerstoffverbrauchs ersehen, wobei allerdings die Oxidation endogenen Glykogens und Lipids nicht berücksichtigt wird, ebensowenig wie der Fehler, der durch nicht markierte Fettsäuren an Albumin bis zu 20% möglich ist.

2.6. Versuchsauswertung

Die Berechnung der Kontraktionsarbeit pro Schlag (A_s) und Kontraktionsleistung pro Stunde (P_h) sowie die Umsatzrate der verschiedenen Substrate wurden für einen Tischrechner (Hewlett-Packard 20) programmiert und für die einzelnen Versuchsgruppen die Mittelwerte mit Standardabweichung der Mittelwerte berechnet (Anzahl der Einzelwerte = n).

Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde nach Student's t-Test oder nach dem verteilungsfreien Rangtest nach Wilcoxon bestimmt, wobei ein t-Test, entsprechend der Geigy Tabelle für $p < 0{,}05$ als signifikant angesehen wurde (Winne 1964, 1967).

Bei der statistischen Auswertung der Versuche über den Einfluß von Carbocromen auf den Stoffwechsel zeigte sich, daß die Vorhöfe bereits in ihren Ausgangsleistungen und dadurch auch in der Höhe der Oxidationsrate vor der Carbocromenzugabe verschieden sind. Errechnet man nun die Ausgangs- und Endleistung und die $^{14}CO_2$-Rate vor und nach

Zugabe, so ergeben sich trotz prozentual gleichem An- bzw. Abstieg der Leistung und $^{14}CO_2$-Rate Mittelwerte mit großem Streuungsbereich. Aus diesem Grund wurde die Signifikanz durch den t-Test für Paare ermittelt. Die prozentuale Änderung der Parameter nach Zugabe von Carbocromen wurde aus den einzelnen Versuchen errechnet und aus diesen prozentualen Änderungen der Mittelwert bestimmt.

Für den funktionellen Teil der Untersuchungen wurden Dosis-Wirkungskurven in kumulativer Form aufgestellt, d.h. nach Abwarten der Maximalwirkung wurde sogleich die nächst höhere Dosis gegeben und zwar in Dosisschritten von 1/2 bzw. 1/3 log. 10 (von Rossum, 1963). Die Konzentrationen wurden in g/ml angegeben:

Umrechnungsfaktoren:

1 mg/ml = 2,76 mM Carbocromen

1 mM (10^{-3} M) = 0,362 mg/ml

$1 \cdot 10^{-4}$ M = $3,62 \cdot 10^{-5}$ g/ml

$5 \cdot 10^{-5}$ g/ml = $1,4 \cdot 10^{-4}$ M

3. Versuchsergebnisse

3.1. Wirkung von Carbocromen auf die Funktion des Meerschweinchenherzvorhofes

Bei Untersuchungen über die Wirkung von Substanzen auf den Stoffwechsel ist es von großem Vorteil, wenn die jeweilige Substanz möglichst wenig an der Funktion des Herzens ändert. Bei Änderung des Stoffwechsels nach der Zugabe einer Substanz und gleichzeitiger Änderung der Inotropie oder Chronotropie (Schneider et al., 1970, 1972) läßt sich nur sehr schwer sagen, ob die Stoffwechseländerung direkt durch die Substanz oder über die funktionelle Änderung hervorgerufen wird. Es wird deshalb dem eigentlichen Thema, dem Einfluß auf den Stoffwechsel, ein kurzer Abschnitt über den Einfluß auf die Funktion des Meerschweinchenherzvorhofes vorangestellt.

3.1.1. Einfluß auf die Frequenz des spontan schlagenden Herzvorhofes

Bei Inkubation ganzer, spontan schlagender Herzvorhöfe in K-H-Lösung mit 15 mM Glucose kommt es nach ca. 1 Stunde zu einer Einstellung der Frequenz bei Werten zwischen 120 bis 150 Schlägen pro Minute. Nach Zugabe von

Carbocromen kommt es dosisabhängig zu einem Abfall der Frequenz. Dieser negativ chronotrope Effekt beginnt bei Wirkstoffkonzentrationen von 5 x 10^{-7} bis 1 x 10^{-6} g/ml Carbocromen zunächst in geringem Umfang. Ab einer Konzentration von 2,5 x 10^{-6} g/ml kommt es zu einem deutlichen Abfall der Frequenz. Der Eintritt von toxischen Wirkungen ist von Vorhof zu Vorhof verschieden. Bei Konzentrationen von 1 x 10^{-4} g/ml bis 1 x 10^{-3} g/ml kommt es zum Auftreten von Extrasystolen, zur Ausbildung einer Rückstandskontraktur (Abb. 4) und schließlich zur Asystolie.

Diese Abhängigkeit der Frequenz von aufsteigenden, kumulativen Konzentrationen von Carbocromen kommt in Abb. 5 zum Ausdruck. Die Aufstellung einer Dosis-Wirkungskurve ist nur bis zu einer Konzentration von 7,5 x 10^{-3} g/ml sinnvoll, da sich die Vorhöfe ab dieser Konzentration sehr unterschiedlich verhalten (s.o.). Eine Dosis-Wirkungskurve der positiv inotropen Wirkung, die bei etwa 1 x 10^{-5} g/ml beginnt, wurde nicht ausgearbeitet, da im Unterschied zu der Wirkung auf den Schrittmacher, die sehr rasch auftritt, die positiv inotrope Wirkung wie bei Herzglykosiden treppenförmig verläuft und bis zur Einstellung eines Gleichgewichts über 1 Stunde Zeit verstreicht (siehe Abb. 6).

Da wir bei unseren Stoffwechseluntersuchungen mit

Carbocromenkonzentrationen von 5 x 10^{-5} g/ml arbeiteten und sich hier bereits ein sehr deutlicher negativ chronotroper Effekt zeigt, entschlossen wir uns, nur linke Herzvorhöfe zu verwenden, und diese mit konstanter Frequenz (f) = 90/min (1,5 Hz) elektrisch zu stimulieren. Damit wurde ein den Energiestoffwechsel stark beeinflussender Funktionsparameter (Siess et al., 1974) konstant gehalten.

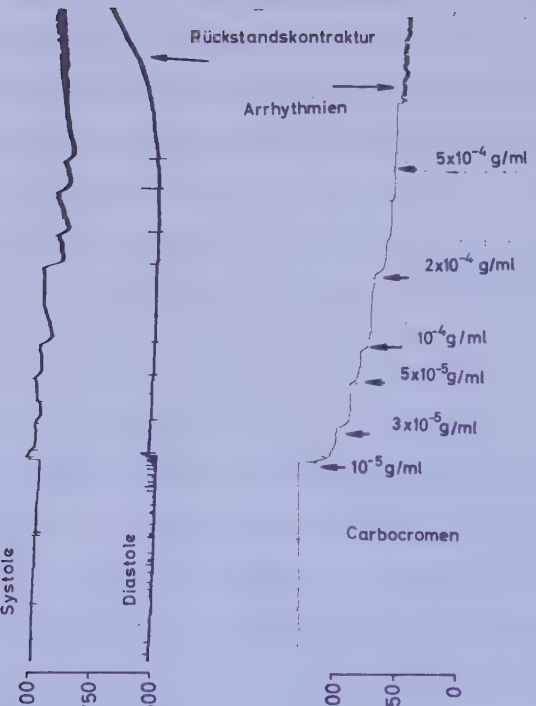
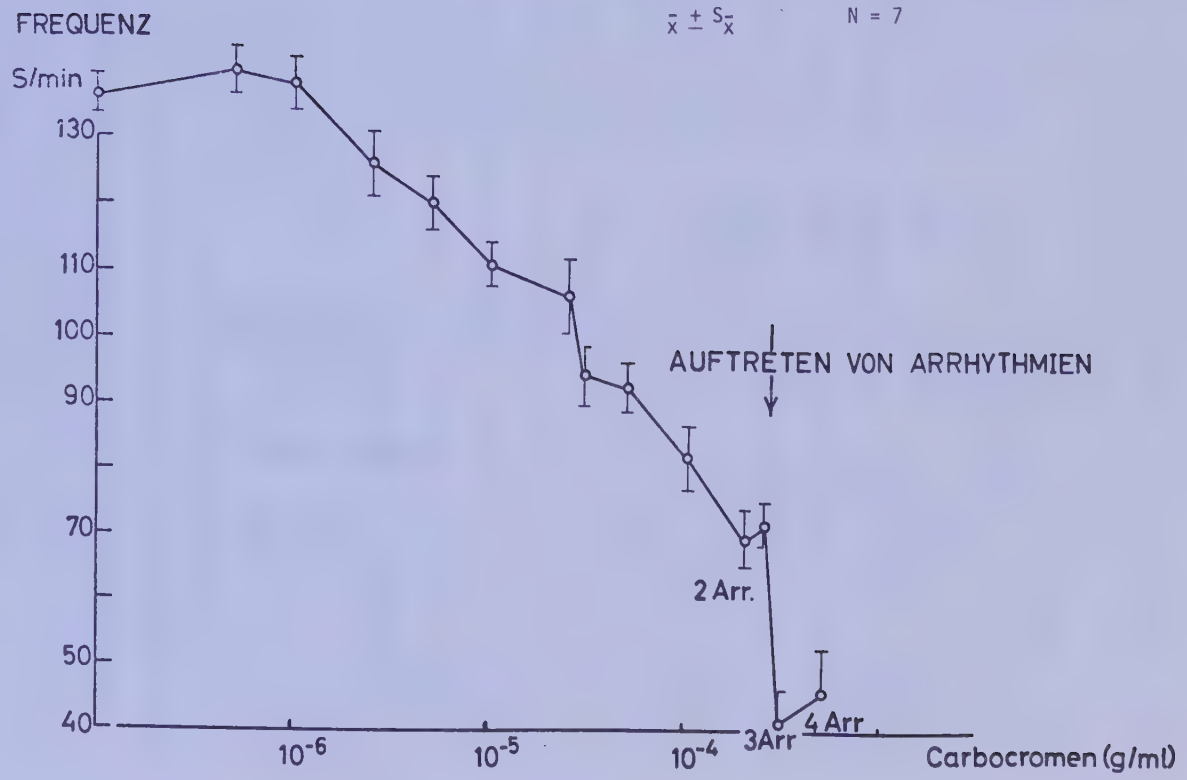


Abb.: 4 Originalregistrierung des spontan schlagenden Herzvorhofs bei aufsteigenden, kumulativen Konzentrationen von Carbocromen.

Abb.: 5 Kumulative Dosis-Wirkungskurve von Carbocromen



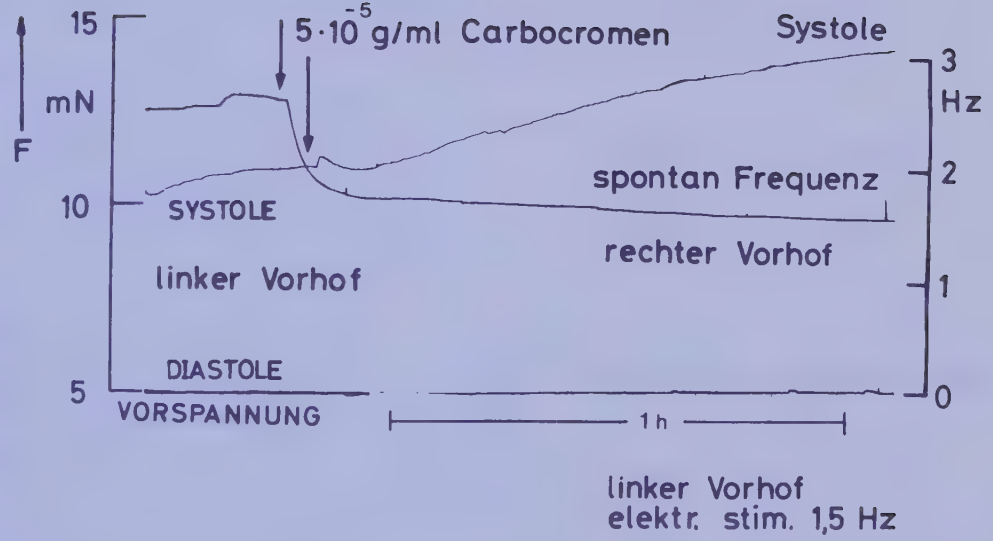


Abb.: 6 Wirkung von Carbocromen auf die Frequenz des spontan schlagenden rechten Herzvorhofs und auf die Kontraktionskraft des elektrisch stimulierten linken Herzvorhofs (Versuch und Zeichnung: K. Stieler).

3.1.2. Einfluß von Carbocromen auf die Inotropie beim elektrisch gereizten Herzvorhof

Bereits bei früheren Untersuchungen (Süßkand, 1976) war bei spontan schlagenden Herzvorhöfen nach Zugabe von Carbocromen eine positiv inotrope Wirkung verbunden mit einem Frequenzabfall beschrieben worden. Es zeigte sich bei unseren Untersuchungen auch bei konstanter Reizfrequenz eine positiv inotrope Wirkung. Nach Zugabe von jeweils 5×10^{-5} g/ml Carbocromen kam es bei fast allen elektrisch stimulierten Vorhöfen zu einem charakteristischen Verlauf der Kontraktionskraft: Bereits nach 10 - 20 sec kam es zu einem kurzen, steilen Anstieg der Kurve, welche nach ungefähr einer Minute einen ersten Gipfelpunkt erreichte. Anschließend kam es im Verlauf von 3 - 5 Minuten zu einem Abfall auf einen Punkt, welcher im Mittel im Bereich des Ausgangspunktes lag. Nun folgte ein langsamer, kontinuierlicher Anstieg der Kontraktionskurve, welcher nach ca. 30 - 60 Minuten seinen Höhepunkt erreichte. Hier hielt sich die Amplitude ca. eine Stunde, um anschließend langsam und kontinuierlich abzufallen. In Abb. 6 ist das Verhalten der Frequenz und der Kontraktionskraft nach Carbocromenzugabe ersichtlich. Es handelt sich um eine Originalregistrierung eines Versuches mit einer besonderen Apparatur, wo der linke Vorhof wie üblich in die

Plexiglashalterung eingespannt wurde, und gleichzeitig in das gleiche Kammersystem eine zweite Halterung eingebracht wurde, die es ermöglichte, vom rechten Vorhof über ein Verstärkersystem dessen "EKG" abzuleiten (Für die Durchführung bin ich Herrn K. Stieler zu besonderem Dank verpflichtet).

Errechnet man die Kontraktionsleistung pro Stunde (P_h) vor und nach Carbocromenzugabe (5 x 10^{-5} g/ml), ergibt sich folgendes: Vor Zugabe der Substanz beträgt die Leistung 231,04 cm p/h ± 12,4 (n=34). Nach Zugabe kommt es zu einer Leistungszunahme auf 275,82 cm p/h ± 15,2. Die Leistungszunahme beträgt 19,28% und ist bei einem $p < 0,025$ signifikant. Da die Frequenz mit 90 Schlägen/min konstant bleibt, ist die positiv inotrope Wirkung von Carbocromen sicher frequenzunabhängig. Dieses typische Verhalten zeigte sich allerdings nur bei nicht vorgeschädigten Vorhöfen. Waren die Herzmuskelpräparate deutlich hypoxisch vorgeschädigt, wie in Kapitel 3.2.1.2. beschrieben, kam es bereits nach Versuchsbeginn zu einem langsamen, aber kontinuierlichen Abfall der Amplitude, welcher nach Zugabe von Carbocromen nur kurzfristig (ca. 10 - 20 Minuten aufgehalten wird, ohne daß eine deutliche positiv inotrope Wirkung mehr zu beobachten ist.

In Abb. 9 ist der typische Verlauf der Kontraktionsamplitude bei einem vorgeschädigten Vorhof nach Zugabe

von Carbocromen anhand einer Versuchsaufzeichnung ersichtlich.

3.2. Einfluß von Carbocromen auf den Stoffwechsel des Herzvorhofes

Um Verschiebungen der Substratanteile an der Oxidation deutlich zu machen, wurden die Vorhöfe in Nährlösungen gleichzeitig mit 2 Substraten, von welchen jeweils ein Substrat ^{14}C-markiert war, inkubiert. Nach der Präparation und Fixierung des Vorhofs im Muskelfuß wurde das Präparat in die Versuchskammer gebracht und bei einer Badtemperatur von 30°C mit einer Frequenz von 1,5 Hz elektrisch stimuliert. Die $^{14}CO_2$-Rate aus dem Abbau des ^{14}C-markierten Substrates stieg an, bis nach ca. 1 1/2 bis 2 Stunden ein steady state erreicht war. Nun wurde 5×10^{-5} g/ml Carbocromen zugegeben und die Änderung in der $^{14}CO_2$-Rate abgewartet. Diese trat meistens nach einem Intervall von 15 - 20 Minuten auf (Latenzzeit des Systems und Latenzzeit im Stoffwechsel) und je nach markiertem Substrat stellte sich etwa 1 1/2 Stunden nach Zugabe auf ein neues Gleichgewicht ein. Änderungen wurden jeweils auf den Initialwert bezogen. Um das Verhalten des "stummen", nicht markierten Substrates zu ermitteln, wurde dieses in einer 2. Versuchsreihe markiert und entsprechend

das vorher untersuchte als unmarkiertes Substrat zugegeben.

3.2.1. Wirkung auf den Stoffwechsel bei wechselseitig ^{14}C-markierter Glucose und Palmitinsäure

Während der Zeit der Einarbeitung in die Präparationsmethode kam es wiederholt zu einer hypoxischen Schädigung des Vorhofpräparates. Diese Herzvorhöfe zeigten nun ein anderes Funktions- und Stoffwechselverhalten als die nicht durch Hypoxie vorgeschädigten Präparate. Es wird deshalb im folgenden zwischen "nicht vorgeschädigten" und "hypoxisch vorgeschädigten" Herzvorhöfen unterschieden.

3.2.1.1. Stoffwechselverhalten von nicht vorgeschädigten Herzvorhöfen mit wechselseitig markierter Glucose und Palmitinsäure

a. Inkubation mit 15 mM ^{14}C-Glucose und 0,5 mM Palmitinsäure + 0,5 % Albumin

Wird nach Erreichen des steady state Carbocromen zugegeben, nimmt die Leistung (P_h) innerhalb von 10 - 30 Minuten von 283,3 $\pm$ 20,0 p·cm/h bis zum jeweiligen Optimum auf 342,6 $\pm$ 26,7 p·cm/h (21%) zu, um dann nach ca. 1/2 - 2 Stdn. auf einen Wert von 325,5 $\pm$ 29,7 p·cm/h (14%) allmählich abzusinken.

Die $^{14}CO_2$-Rate begann 15 Minuten nach Zugabe von Carbocromen von einem Ausgangswert von 635,7 ± 30,3 nMol/h·100 mg auf 699,3 ± 32 anzusteigen und fiel anschließend auf 573,2 ± 37,9 nMol/h·100 mg ab. Das Optimum in der $^{14}CO_2$-Rate wurde jeweils 15 Minuten nach dem Kontraktionsmaximum erreicht. Es kam also nach Carbocromenzugabe zunächst zu einem Anstieg der $^{14}CO_2$-Rate um 10% ± 1,3. Dieser vermehrte Umsatz an ^{14}C-Glucose dauerte jedoch nur ca. 10 - 20 Minuten. Nach einer Stunde stellte sich das Gleichgewicht der $^{14}CO_2$-Rate 10% + 2,85 unterhalb des Ausgangswertes ein, trotzdem die Leistung zu diesem Zeitpunkt signifikant über dem Ausgangswert lag (Abb. 7). Dieser Abfall in der $^{14}CO_2$-Rate ist signifikant ($p < 0,02$, $n=5$).

b. Inkubation mit 0,5 mM ^{14}C-Palmitinsäure + 0,5 % Albumin und 15 mM Glucose

Hier kommt es zunächst nach Zugabe von Carbocromen zu einer maximalen Leistungssteigerung um 18% ± 3,3 entsprechend den vorhergehenden Versuchen, die im Lauf einer Stunde auf einen Wert absank, der noch signifikant über dem Ausgangswert lag ($p < 0,02$, $n=5$). Die $^{14}CO_2$-Rate aus der Verbrennung von ^{14}C-Palmitat steigt zunächst um 8% ± 2,3 von 101,2 ± 10,3 nMol/h·100 mg auf 109,1 ± 10,8 nMol/h 100 mg an. Der Anstieg der $^{14}CO_2$-Rate korrelierte mit dem

Anstieg der Kontraktionsleistung zeitlich, doch war bei einem Anstieg der Kontraktionsarbeit um 18% der Anstieg der Oxidationsrate mit 8% deutlich geringer. Bei der Endbestimmung 1 1/2 - 2 Stunden nach Zugabe wurde mit 101,9 ± 8,3 nMol/h·100 mg der Ausgangswert wieder erreicht (Abb. 8). Dabei lagen von 5 Versuchen noch 2 mit + 15% und + 4% über dem Ausgangswert, während 3 Versuche mit - 3%, - 3% und - 4,7% unter dem Ausgangswert lagen. Es kommt also durch die Carbocromenzugabe weder zu einer längeren Steigerung noch zu einem Abfall der Palmitatoxidation.

c. Der Sauerstoffverbrauch und Substratanteil an der Oxidation vor und nach Carbocromenzugabe

Der aus der $^{14}CO_2$-Rate stöchiometrisch errechnete Gesamtsauerstoffverbrauch in beiden Versuchsreihen zeigte folgendes: Zum Zeitpunkt des Maximums der Kontraktionsleistung ergab sich aus dem Anstieg der Oxidationsrate aus Glucose und Palmitinsäure eine Erhöhung des O_2-Verbrauchs von 6,14 ± 0,42 uMol/h·100 mg auf 6,71 uMol/h·100 mg. Da die Leistung bei Versuchsende immer noch zwischen 13 bzw. 14,4% über den Ausgangswerten lag, ist der dabei gemessene Sauerstoffverbrauchswert von 5,78 (- 5,9%), der nicht signifikant vom Ausgangswert unterschieden ist, wahrscheinlich zu niedrig, so daß angenom-

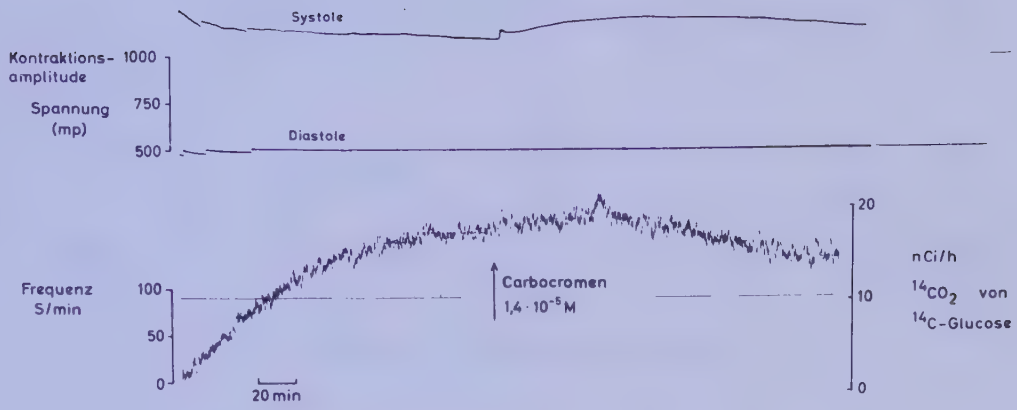


Abb.: 7 Originalregistrierung eines "normalen" linken Vorhofs bei Inkubation mit 15 mM ^{14}C-Glucose und 0,5 mM Palmitinsäure.

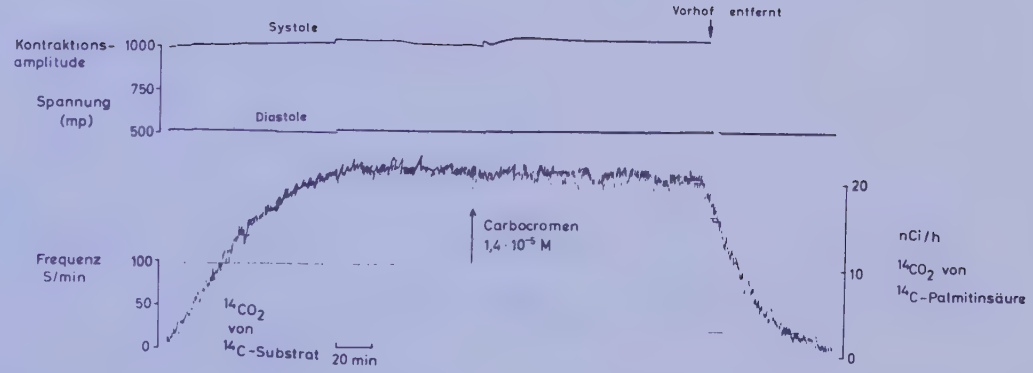


Abb.: 8 Originalregistrierung eines "normalen" linken Vorhofs bei Inkubation mit 0,5 mM ^{14}C-Palmitinsäure und 15 mM Glucose.

men werden muß, daß hierbei endogenes Substrat vermehrt am Umsatz beteiligt ist (wie in der Diskussion näher ausgeführt wird). Ohne Einrechnung endogenen Substrats beträgt der Anteil am Gesamtsauerstoffverbrauch vor Zugabe 62% Glucose und 38% Palmitinsäure, auf dem Maximum der Oxidationsrate 62,6% Glucose und 37,4% Palmitinsäure und am Ende 59,5% Glucose und 40,5% Palmitinsäure.

3.2.1.2. Stoffwechselverhalten von hypoxisch vorgeschädigten Herzvorhöfen bei Inkubation mit wechselseitig markierter Glucose und Palmitinsäure

Nachdem festgestellt worden war, daß sich durch Hypoxie vorgeschädigte Herzvorhöfe in Funktion und Stoffwechsel anders verhalten als nicht geschädigte Herzvorhöfe, wurde eine Versuchsreihe mit Vorhofpräparaten gemacht, welche auf folgende Weise geschädigt wurden: Die Vorhöfe wurden in nicht mit Carbogen durchperlter Krebs-Henseleit-Lösung mit 15 mM Glucose bei 30°C präpariert und anschließend unter Hypoxie in der Präparierkammer belassen, so daß diese Präparate einmal nur dem O_2-Partialdruck der Luft ausgesetzt waren, zum anderen durch das Problem der "unstirred layer" (Mensing, 1977) einen zweifellos gehemmten Sauerstoff- und Substrataustausch hatten. Die Zeit vom Präparationsbeginn bis zum Verbringen in die Versuchskammer betrug

jeweils 20 Minuten. In der Versuchskammer herrschten dann wieder normoxische Bedingungen mit pH 7,4 wie in der Methodik beschrieben. Am Ende der Präparation wurde der linke Vorhof sofort abgetrennt, so daß dieser etwa 15 Minuten aktionslos in der Präparierkammer verblieb. Dazu kam, daß das pH der Nährlösung bei 8,0 lag, während in der Muskulatur durch Lactatanhäufung als Folge der Hypoxie eine Verschiebung zum sauren Milieu zu erwarten war.

Nachdem nun diese Vorhöfe in die Versuchskammer gebracht wurden, zeigte sich nur zu Reizbeginn normalerweise eine befriedigende Kontraktionsamplitude. Diese nahm jedoch im Verlauf des Versuches verhältnismäßig rasch und kontinuierlich ab. Diese "Ermüdung" wurde wie beschrieben durch die Gabe von Carbocromen nur kurzfristig durch eine Phase mit gleichbleibender Amplitude unterbrochen. Anschließend kam es jedoch zu einem weiteren Abfall der Leistung. Bei einem Teil der Versuche hatte Carbocromen keinerlei Wirkung auf die Inotropie; es kam hier nach Zugabe zu einem weiteren kontinuierlichen Abfall der Kontraktionskraft.

a. Inkubation mit 15 mM ^{14}C-Glucose und 0,5 mM Palmitinsäure + 0,5 % Albumin

Die Einstellung der $^{14}CO_2$-Rate von ^{14}C-Glucose war

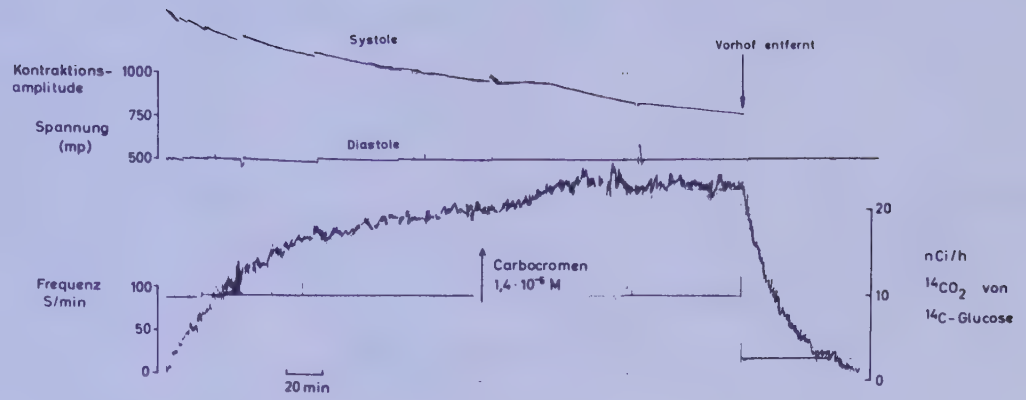


Abb.: 9 Originalregistrierung einer "hypoxisch vorgeschädigten" linken Vorhofs bei Inkubation mit 15 mM ^{14}C-Glucose und 0,5 mM Palmitinsäure.

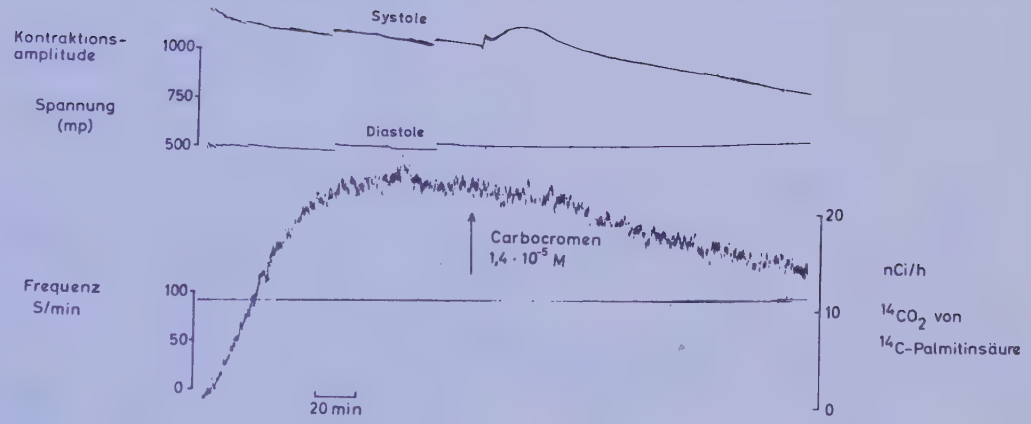


Abb.: 10 Originalregistrierung eines "hypoxisch vorgeschädigten" linken Vorhofs bei Inkubation mit 0,5 mM ^{14}C-Palmitinsäure und 15 mM Glucose.

von den übrigen Versuchen nicht unterschieden und nach 1 1/2 bis 2 Stunden erreicht (Abb. 9).

Da nach Carbocromen kein inotropes Maximum meßbar war, wurde in allen Versuchen nach 90 Minuten Kontraktionskraft und $^{14}CO_2$-Rate, die zu diesem Zeitpunkt meistens ein neues Gleichgewicht erreicht hatte, gemessen, und mit den Ausgangswerten verglichen. Trotz des signifikanten Leistungsabfalls um 21,6% $\pm$ 5,8 ($p < 0,05$, n=7) zeigte sich eine signifikante Zunahme der $^{14}CO_2$-Rate um 16,6% $\pm$ 5,8 ($p < 0,05$, n=7).

b. Inkubation mit 0,5 mM ^{14}C-Palmitat + 0,5 % Albumin und 15 mM Glucose

Die Leistungsabnahme war in dieser Versuchsserie mit 38,7 $\pm$ 5,8 etwas stärker. Im Unterschied zur Oxidationsrate der Glucose ging die Oxidationsrate von Palmitinsäure fast im gleichen Ausmaß wie der Leistungsabfall um 32,5% $\pm$ 3,9 zurück (Abb. 10).

Wichtig erscheint dabei, daß der Beginn der Abnahme der $^{14}CO_2$-Rate zu einem Zeitpunkt erfolgte, an dem der Leistungsabfall noch nicht manifest war.

c. Sauerstoffverbrauch und Substratanteil an der Oxidation vor und nach Carbocromen

Der stöchiometrisch errechnete Sauerstoffverbrauch

betrug vor der Zugabe der untersuchten Substanz 4,06 ± 0,66 und blieb im Bereich der Streuung mit 3,95 ± 0,62 konstant, trotz des Leistungsabfalls um 21%. Der gegenüber ungeschädigten Herzvorhöfen niedrigere errechnete O_2-Verbrauch von 4,06 (- 29%) könnte auch mit der ermittelten mittleren Leistung der Vorhöfe vor Versuchsbeginn zusammenhängen (Tab. 2).

Es kommt zu einer deutlichen Verschiebung der Substratanteile an der Oxidation (Abb. 11). Der Anteil der Palmitinsäure sinkt signifikant von 34% auf 23,5% ab, während der Anteil von Glucose von 66% auf 76,5% zunimmt. Da die Leistung um ca. 30% unter Carbogenen abnimmt, der errechnete O_2-Verbrauch sich aber nicht signifikant verschiebt (- 2%), resultiert hieraus eine Erniedrigung des Nutzeffekts der Kontraktionsarbeit (Siess, 1977).

Es besteht also hierin ein deutlicher Unterschied zu den nicht vorgeschädigten Vorhöfen.

d. Untersuchungen über Elektrolytveränderungen an hypoxisch geschädigten Herzvorhöfen

Das durch die hypoxische Schädigung bedingte veränderte Funktions- und Stoffwechselverhalten der Herzvorhöfe ist eindeutig. Die eigentlichen Ursachen dieses veränderten Verhaltens sind nicht bekannt. Durch das 20-minütige Verbleiben der Vorhöfe in nicht mit Carbogen

Tab. 2

n	P_h (p • cm/h) vor- Carbocromen	P_h (p • cm/h) nach- Carbocromen	Oxid. ^{14}C-Substrat (n Mol/h • 100 mg) vor- Carbocromen	Oxid. ^{14}C-Substrat (n Mol/h • 100 mg) nach- Carbocromen	Stöch. O_2-Verbrauch (µMol/h • 100 mg) vor- Carbocromen	Stöch. O_2-Verbrauch (µMol/h • 100 mg) nach- Carbocromen
"normal"						
^{14}C-Glucose + Palm 5	283,3 ± 20	325,5 ± 29,7	635,9 ± 30,2	573,2 ± 37,9	3,81 ± 0,18	3,44 ± 0,24
		+ 14,4% ± 3		- 10% ± 2,8%		
		p < 0,025		p < 0,02		
^{14}C-Palm + Glucose 5	270,9 ± 33,5	296,5 ± 32,7	101,2 ± 10,3	101,9 ± 8,3	2,33 ± 0,24	2,34 ± 0,19
		+ 13% ± 4		- 0%		
		p < 0,02			6,14	5,78
"hypoxisch geschädigt"						
^{14}C-Glucose + Palm 7	174,2 ± 32,0	132,4 ± 15,6	446,1 ± 77,2	503,8 ± 80,9	2,67 ± 0,46	3,02 ± 0,48
		- 21,6% ± 5,8		- 16,6% ± 5,8		
		p < 0,05		p < 0,05		
^{14}C-Palm + Glucose 6	215,9 ± 25,8	135,3 ± 24,2	60,5 ± 8,9	40,6 ± 5,8	1,39 ± 0,2	0,93 ± 0,14
		- 38,7% ± 5,8		- 32,5% ± 3,9		
		p < 0,005		p < 0,005	4,06	3,95

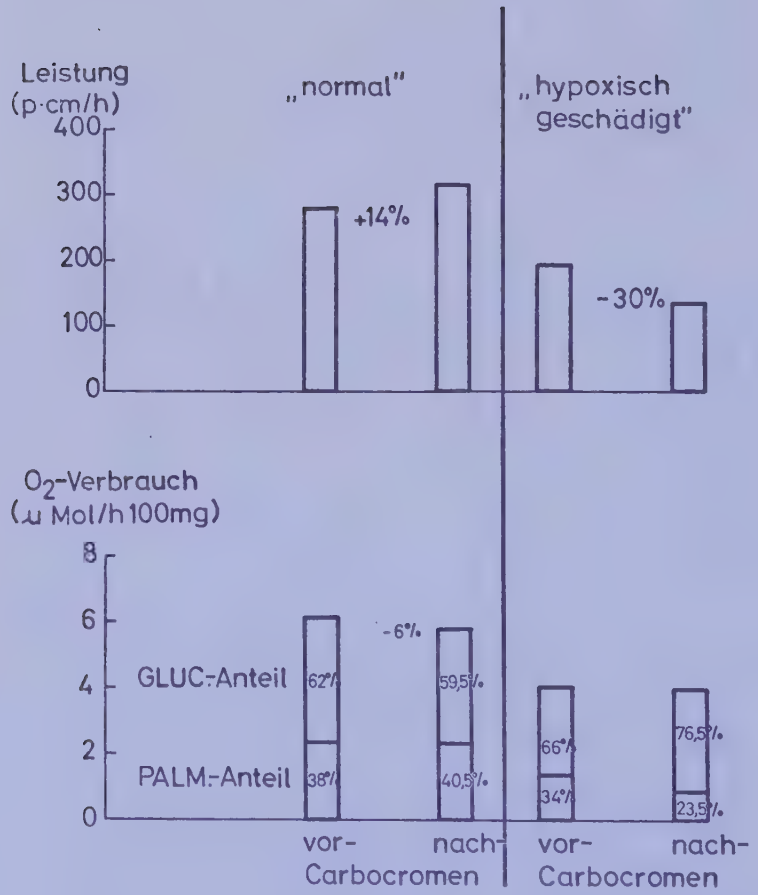


Abb.: 11 Verhalten von Leistung, stöch. Sauerstoffverbrauch und die Anteile der Substrate vor und nach Zugabe von Carbocromen.

durchperlten K-H-Lösung könnte eine Elektrolytverschiebung eintreten. Diese Frage wurde in einer Versuchsserie von je 5 gut versorgten und 5 hypoxisch geschädigten Herzvorhöfen untersucht.

Die Methode der Elektrolytbestimmung an Herzvorhofpräparaten des Meerschweinchens ist bei v. Hees (1976) beschrieben. Die Elektrolytbestimmungen wurden freundlicherweise von Herrn U. v. Hees (Diplom-Biologe am Pharmakologischen Institut) durchgeführt, dem ich dafür herzlich danke.

Die "nicht vorgeschädigten Herzvorhöfe" wurden in carbogengesättigter Lösung bei 30°C ca. 5 Minuten und sofort bei einem Gewicht von 250 g zwischen 2 Filterpapieren die extrazelluläre Flüssigkeit ausgepresst. Anschließend wurde sofort das Feuchtgewicht bestimmt und die Veraschung durchgeführt.

Die "hypoxisch geschädigten Herzvorhöfe" wurden in der oben schon erwähnten Weise behandelt: Präparation in nicht durchperlter K-H-Lösung und Belassen in dieser Lösung bis 20 Minuten nach Präparationsbeginn bei 30°C, anschließend wurden die Vorhöfe ebenfalls ausgepresst und das Feuchtgewicht bestimmt.

Die Feucht- und Trockengewichte beider Gruppen unterscheiden sich nicht statistisch signifikant. Dagegen war der Wassergehalt der Herzvorhöfe deutlich verschieden.

Der Wasseranteil betrug bei den nicht geschädigten Vorhöfen 82,37 ± 0,3% während er bei den hypoxisch geschädigten mit 85,20 ± 0,44% deutlich höher lag. Dieser Unterschied war hochsignifikant ($p < 0,005$). Bei der Untersuchung der Elektrolyte zeigte sich nur bei Natrium eine signifikante Erhöhung gegenüber den nicht geschädigten Vorhöfen, während die Calcium-, Magnesium- und Kaliumwerte weder in Bezug auf die Feuchtgewichte noch auf die Trockengewichte statistisch gesicherte Unterschiede zeigten (Tab. 3).

Tab. 3

	Tier-gewicht (g)	Vorhofgewicht feucht (mg)	Vorhofgewicht trocken (mg)	Gehalt pro Feuchtgewicht (mMol/kg F.G.) Ca-	Mg-	Na-	K-
"normal"	208 ± 8	28,3 ± 1,7	5,0 ± 0,3	3,2 ± 0,4	7,7 ± 0,2	71,9 ± 6,2	78,6 ± 4,0
"hypoxisch geschädigt"	207 ± 6	30,7 ± 2,2	4,5 ± 0,4	2,8 ± 0,2	6,9 ± 0,2	82,3 ± 5,8	75,5 ± 1,9
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p <0,025	n.s.	n.s.

	Wassergehalt %	Gehalt pro Trockengewicht (mMol/kg T.G.) Ca-	Mg-	Na-	K-
"normal"	82,4 ± 0,3	18,1 ± 2,3	43,7 ± 0,6	407 ± 31	447 ± 26
"hypoxisch geschädigt"	85,2 ± 0,4	19,2 ± 1,7	46,9 ± 1,7	553 ± 23	512 ± 22
	p < 0,001	n.s.	n.s.	p <0,01	n.s.

$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ N = 5

3.2.2. Wirkung auf den Stoffwechsel bei wechselseitig ^{14}C-markiertem Palmitat und Hexanoat an nicht geschädigten Herzvorhöfen

In dieser Versuchsreihe wurde der Frage nachgegangen, ob durch Carbocromen Verschiebungen in der Verbrennung von kurz- und langkettigen Fettsäuren auftreten. Als kurzkettige Fettsäure wurde Hexanoat in einer Konzentration von 2 mM und als langkettige Fettsäure Palmitat in einer Konzentration von 0,5 mM verwendet. Da das K_m für Hexanoat bei 0,4 mM (Siess et al., 1970) und für Palmitinsäure bei 0,3 mM (Süßkand, 1976) liegt, entspricht die Konzentration von Hexanoat dem 5-fachen K_m-Wert, während die Konzentration bei Palmitinsäure dem 1,5-fachen K_m-Wert entspricht.

Außer diesen Fettsäuren stand den Vorhöfen noch das gespeicherte Glykogen und endogene Lipide zur Energiegewinnung zur Verfügung.

3.2.2.1. Inkubation mit 2 mM ^{14}C-Hexanoat und 0,5 mM Palmitat + 0,5 % Albumin

Die Leistung der Herzvorhöfe (E_h) lag bei Inkubation mit den zwei Fettsäuren durchschnittlich im gleichen Bereich wie bei der Inkubation mit einer Fettsäure und Glu-

cose (in 3.2.1.).

Nach Zugabe von Carbocromen kam es zu einer Zunahme von E_h um 20,3% ± 5,7 ($p < 0,01$, $n'=6$). Die Einstellung des Gleichgewichts der $^{14}CO_2$-Rate aus der Verbrennung von ^{14}C-Hexanoat dauerte ca. 1,5 Stunden. Die Umsatzrate stieg 10 Minuten nach der Gabe von 5×10^{-5} g/ml Carbocromen an. 30 - 60 Minuten nach der Zugabe hatte sich ein neues Gleichgewicht eingestellt. Dieses lag 14,1% ± 2,3 höher als der Ausgangswert. Die Steigerung der $^{14}CO_2$-Rate war mit $p < 0,01$ hoch signifikant. Es kommt hier also entsprechend der höheren Leistung zu einer höheren Verbrennungsrate von ^{14}C-Hexanoat (Abb. 12).

3.2.2.2. Inkubation mit 0,5 mM ^{14}C-Palmitat + 0,5 % Albumin und 2 mM Hexanoat

Die Leistungssteigerung durch Carbocromen betrug hier im Mittel von 5 Versuchen 17,2% ± 4,1 ($p < 0,05$). Das Gleichgewicht der $^{14}CO_2$-Rate aus ^{14}C-Palmitinsäure stellte sich erwartungsgemäß (Süßkand, 1976) auf einem wesentlich tieferen Niveau als das von ^{14}C-Hexanoat ein. Nach Carbocromenzugabe kam es trotz der oben erwähnten Leistungssteigerung zu einem Rückgang der Decarboxylierungsrate um 33,2% ± 3,6. Dieser Abfall ist hoch signifi-

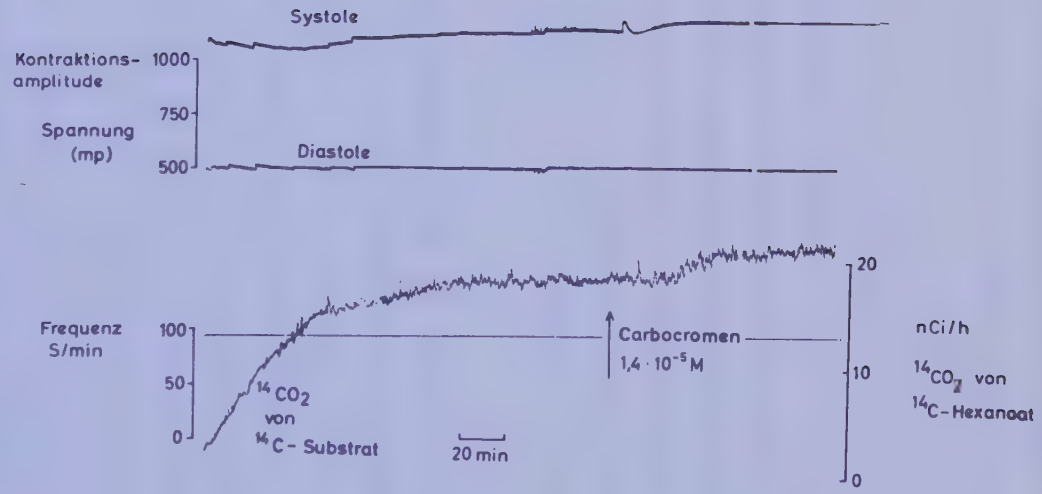


Abb. 12: Originalregistrierung eines "normalen" linken Vorhofs bei Inkubation mit 2 mM ^{14}C-Hexanoat und 0,5 mM Palmitinsäure.

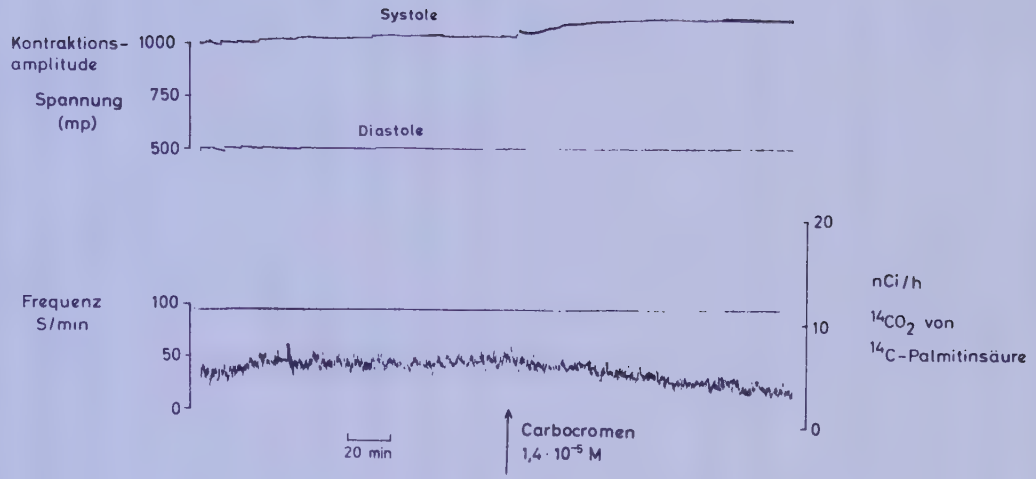


Abb.: 13 Originalregistrierung eines "normalen" linken Vorhofs bei Inkubation mit 0,5 mM ^{14}C-Palmitinsäure und 2 mM Hexanoat.

kant ($p < 0{,}005$, $n'=5$). Der Beginn des ^{14}C-Abfalls lag 30 - 60 Minuten nach der Zugabe von Carbocromen, das neue Gleichgewicht hatte sich 1 Stunde später eingestellt. Dieses Verhalten nach Carbocromen (Abfall der ^{14}C-Palmitat-Verbrennung bei Leistungssteigerung) zeigte sich in allen Versuchen mit ^{14}C-Palmitat und unmarkiertem Hexanoat (Abb. 13).

3.2.2.3. Sauerstoffverbrauch vor und nach Zugabe von Carbocromen

Der errechnete Sauerstoffverbrauch aus den exogen zugeführten Substraten betrug vor Zugabe von Carbocromen 7,49 µMol/h u. 100 mg Feuchtgewicht. Hierbei machte die Hexanoatverbrennung einen Anteil von 91,7% und die Verbrennung von Palmitat 8,3% am Sauerstoffverbrauch aus (Abb. 14 u. Tab. 4). Entsprechend der Leistungszunahme nach der Zugabe von Carbocromen kam es zu einer Zunahme des Sauerstoffverbrauchs auf 8,25 µMol/h·100 mg (Leistungszunahme 18,8% ± 4,7, Zunahme des O_2-Verbrauchs 10% ± 1). Der Anteil der Hexanoatverbrennung am O_2-Verbrauch nahm dabei auf 95% zu, der Anteil der Palmitinsäure entsprechend auf 5% ab. Wegen dieses geringen Anteils der Palmitinsäure am O_2-Verbrauch machte sich der Abfall in der Verbrennung dieses Substrates beim Gesamtsauerstoffverbrauch kaum bemerkbar. Der durch die Steigerung der Hexanoatverbrennung

Tab. 4

	n	P_h (p • cm/h) vor- Carbocromen	P_h (p • cm/h) nach- Carbocromen	Oxid. ^{14}C-Substrat (n Mol/h • 100 mg) vor- Carbocromen	Oxid. ^{14}C-Substrat (n Mol/h • 100 mg) nach- Carbocromen	Stöch. O_2-Verbrauch (µMol/h • 100 mg) vor- Carbocromen	Stöch. O_2-Verbrauch (µMol/h • 100 mg) nach- Carbocromen
^{14}C-Palm-Hexanoat	5	228,4 ± 9,5	262,7 ± 6,4 + 17,2% ± 4,1 $p < 0,05$	26,8 ± 2,3	17,6 ± 2,0 - 33,2% ± 3,6 $p < 0,005$	0,62 ± 0,05	0,41 ± 0,05
^{14}C-Hexanoat-Palm	6	248,8 ± 34,1	282,4 ± 31,2 + 20,3% ± 5,7 $p < 0,01$	858,5 ± 119,6	980,5 ± 139,3 + 14% ± 2,3 $p < 0,01$	6,87 ± 0,96	7,84 ± 1,11
						7,49	8,25

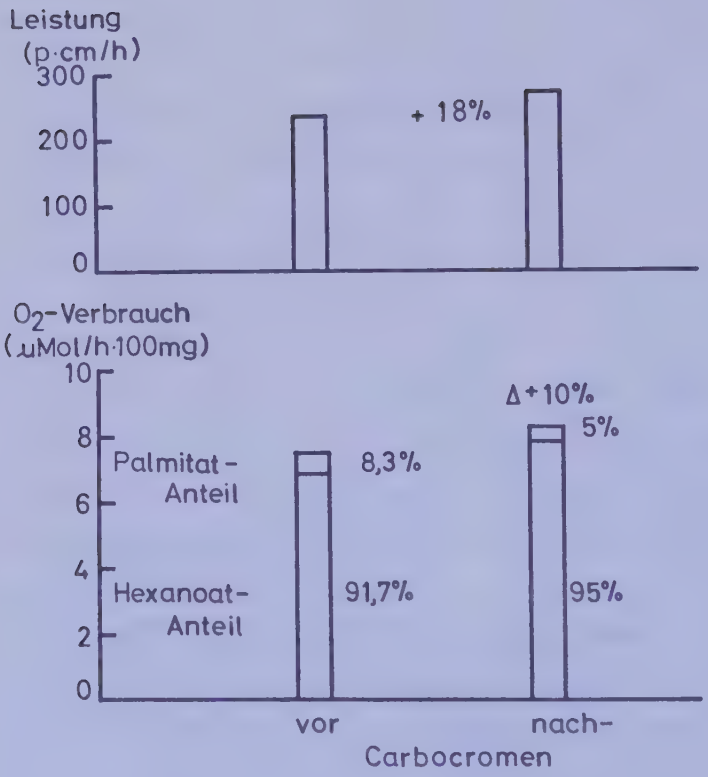


Abb.: 14 Stöch. O_2-Verbrauch, prozentuale Anteile der Substrate und die Leistung vor und nach Zugabe von Carbocromen.

gestiegene O_2-Verbrauch übertraf den durch den Abfall der Palmitatverbrennung eingesparten Sauerstoff um mehr als das 3 1/2-fache.

3.2.3. Wirkung von Carbocromen auf den Stoffwechsel bei wechselseitig ^{14}C-markierter Glucose und Hexanoat an nicht geschädigten Herzvorhöfen

Trotz guter Wasserlöslichkeit beider Substrate wurde auch hier die gleiche Versuchskammer verwendet wie für die Versuche mit Palmitinsäure, um die gleichen Bedingungen für alle Versuche zu erhalten.

In der ersten Versuchsreihe wurde Hexanoat in einer Konzentration von 2 mM und Glucose in einer Konzentration von 15 mM verwendet. Dies entspricht dem 5-fachen K_m-Wert für Hexanoat und 1,5-fachen für Glucose.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Hexanoatkonzentration auf 0,5 mM gesenkt. Dies entspricht ungefähr dem 1 1/4-fachen K_m-Wert und liegt somit etwa im Bereich der benützten Glucosekonzentration.

3.2.3.1. Inkubation mit 2 mM Hexanoat und 15 mM Glucose bei wechselseitiger Markierung

a) Inkubation mit 2 mM ^{14}C-Hexanoat und 15 mM Glucose

Die Leistungssteigerung (E_h) betrug nach Zugabe

von Carbocromen 21,1% ± 7 ($p < 0,05$, $n'=5$). Nachdem sich das Gleichgewicht der Decarboxylierungsrate schon auf einem hohen Niveau eingestellt hatte, kam es nach der Carbocromenzugabe zu einer weiteren Erhöhung der $^{14}CO_2$-Rate um 12,3% ± 3,5. Diese Erhöhung war signifikant ($p < 0,02$, $n'=5$).

b) Inkubation mit 15 mM ^{14}C-Glucose und 2 mM Hexanoat

Die Herzvorhöfe reagierten hier auf Carbocromen mit einer Leistungssteigerung um 54,9% ± 16. Mit dieser Substratkonstellation wurden jedoch nur 3 Versuche gemacht. Dadurch ist auch die große Abweichung der Mittelwerte erklärlich. Der Grund für die geringe Anzahl liegt im Stoffwechselverhalten: Schon nach 3 Versuchen war deutlich zu erkennen, daß nach Zugabe von Carbocromen keine wesentliche Veränderung in der Decarboxylierungsrate eintrat. Es kam wohl zu einem geringen Anstieg der $^{14}CO_2$-Rate um 4,35% ± 2,2. Diese Zunahme war jedoch statistisch bei weitem nicht signifikant, so daß man davon ausgehen muß, daß es bei obigem Substratangebot trotz erheblicher Leistungszunahme zu keiner Änderung in der Glucoseverbrennungsrate kommt.

c) Sauerstoffverbrauch vor und nach Zugabe von Carbocromen

Bei Inkubation der Herzvorhöfe mit 2 mM Hexanoat und 15 mM Glucose läßt sich ein Verhältnis von 92% Hexanoat

und 8% Glucose am Gesamtsauerstoffverbrauch feststellen. Diese Werte korrelieren gut mit den von Süßkand (1976) gefundenen Werten: Hier wurde eine Hemmung der Oxidation von 15 mM ^{14}C-Glucose bei 5-fachem K_m-Wert von Hexanoat um 90% gefunden. Das Verhältnis von Glucose : Hexanoat am Gesamtsauerstoffverbrauch verschob sich bei den o.g. Substratkonzentrationen nur unwesentlich. Der Glucoseanteil fiel von 8% auf 7,5%, der Hexanoatanteil nahm entsprechend von 92% auf 92,5% zu.

Der Gesamtsauerstoffverbrauch nahm bei einer Leistungssteigerung von 36% um 14% zu. Der vermehrte Substratverbrauch wurde voll durch das Hexanoat gedeckt.

3.2.3.2. Inkubation mit 0,5 mM Hexanoat und 15 mM Glucose bei wechselseitiger ^{14}C-Markierung

a)Inkubation mit 0,5 mM ^{14}C-Hexanoat und 15 mM Glucose

Auch hier lag die Leistungssteigerung nach der Gabe von Carbocromen mit ca. 22% in der Größenordnung der anderen Versuche. Im Gegensatz zu der Versuchsreihe mit 2 mM Hexanoat kam es nach Carbocromen zu einem mit 4,9% $\pm$ 3,9 geringen Abfall der $^{14}CO_2$-Rate. Dieser ist nicht signifikant. Signifikanz besteht jedoch gegenüber dem Anstieg um 12% bei 2 mM Hexanoat.

b) Inkubation mit 15 mM ^{14}C-Glucose und 0,5 mM Hexanoat

Nach der mit der üblichen Leistungssteigerung (+ 17%) verbundenen Zugabe von Carbocromen kam es zu einem deutlichen Anstieg der Decarboxylierungsrate. Die Verbrennungsrate der Glucose nahm um 47,3% ± 7,7 zu ($p < 0,025$, $n'=4$). Diese starke Zunahme der $^{14}CO_2$-Rate unterscheidet sich erheblich vom Verhalten des Glucoseumsatzes bei der Kombination mit 2 mM Hexanoat.

c) Sauerstoffverbrauch vor und nach Zugabe von Carbocromen

Der Leistungszuwachs mit durchschnittlich 19,5% lag bei dieser Versuchsgruppe deutlich über dem mit 2% relativ geringem Anstieg des Gesamtsauerstoffverbrauchs. Es ist anzunehmen, daß ein großer Teil des Energiemehrverbrauchs wegen des geringeren Hexanoatangebots aus dem endogenen Glykogenpool gedeckt wurde. Der Anteil der Glucose am Gesamtsauerstoffverbrauch machte hier vor Zugabe von Carbocromen 15,5% aus und lag etwa doppelt so hoch wie bei der Kombination mit 2 mM Hexanoat. Durch die Carbocromengabe kam es zu einer Zunahme des Anteils der Glucoseverbrennung auf 21,5%. Entsprechend ging der Anteil der Hexanoatverbrennung bei der niederen Konzentration bei der Zugabe von ursprünglich 84,5% auf 78,5% zurück. Der Anteil der Glucose am Sauerstoffverbrauch nahm also einmal durch die erniedrigte Hexanoatkonzentration um 8% zu. Wurde bei

Tab. 5

	n	P_h (p • cm/h) vor- Carbocromen	P_h (p • cm/h) nach- Carbocromen	Oxid. ^{14}C-Substrat (n Mol/h • 100 mg) vor- Carbocromen	Oxid. ^{14}C-Substrat (n Mol/h • 100 mg) nach- Carbocromen	Stöch. O_2-Verbrauch (µMol/h • 100 mg) vor- Carbocromen	Stöch. O_2-Verbrauch (µMol/h • 100 mg) nach- Carbocromen
^{14}C-Hexanoat (2mM) - Glucose	5	230,9 ± 7,8	269,1 ± 21,1 + 21,1% ± 7,3	634,9 ± 51,1	727,3 ± 30,5 + 12,3% ± 3,5	5,08 ± 0,41	5,82 ± 0,24
^{14}C-Glucose-Hexanoat (2mM)	3	119,4 ± 51,1	167,5 ± 65,5 + 54,9% ± 16	75,8 ± 27,1	79,9 ± 29,8 + 4,35% ± 2,2	0,45 ± 0,16	0,48 ± 0,18
						5,53	6,30
^{14}C-Hexanoat (0,5mM) - Glucose	4	228,5 ± 11,3	293,3 ± 47,1 + 22%	767,4 ± 31,7	727,6 ± 4,9 - 4,9% ± 3,9% P < 0,4	6,14 ± 0,25	5,82 ± 0,04
^{14}C-Glucose-Hexanoat (0,5mM)	4	283,9 ± 21,2	333,1 ± 44,6 + 16,9% ± 12	187,3 ± 23,5	263,9 ± 26,2 + 42,3% ± 7,7	1,12 ± 0,14	1,58 ± 0,16
						7,26	7,40

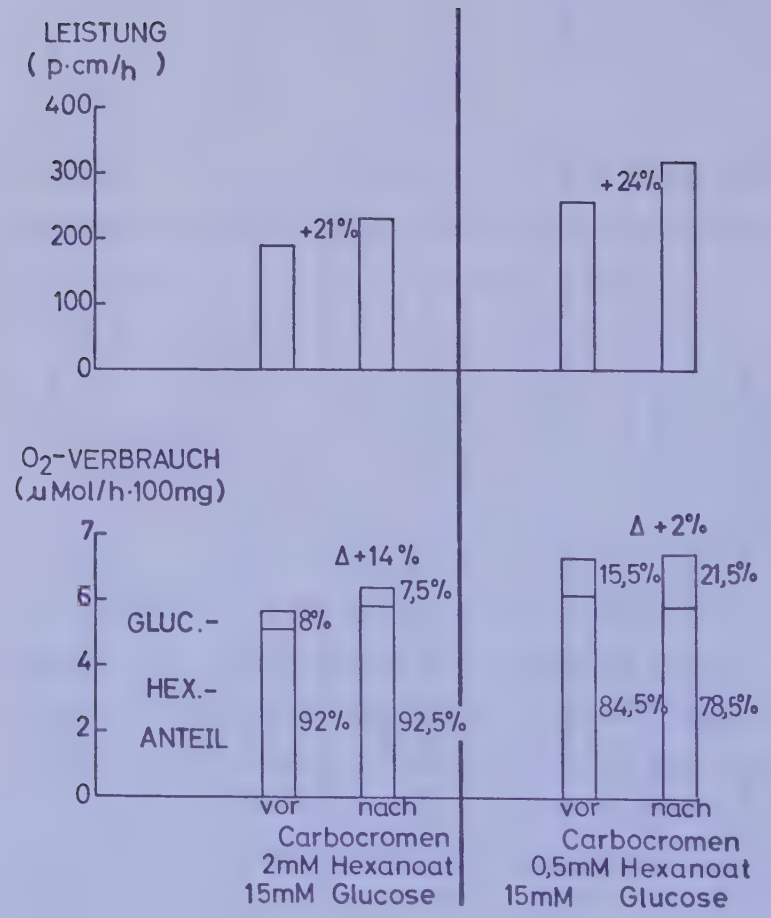


Abb.: 15 Stöch. O_2-Verbrauch, Anteile der Substrate und die Leistung vor und nach Carbocromen bei verschiedenen Konzentrationen von Hexanoat.

erniedrigter Hexanoatkonzentration (0,5 mM) Carbocromen zugegeben, kam es zu einer weiteren Zunahme des Glucoseanteils um 6% (Abb. 15 u. Tab. 5).

3.2.3.3. Direkte Sauerstoffverbrauchsmessung vor und nach Carbocromen bei Inkubation mit ^{14}C-Hexanoat (2 mM) und 15 mM Glucose

In einer speziellen Meßapparatur, deren Vorläufer von Siess, Keller et al. 1970 beschrieben und in entscheidenden Punkten von Mensing 1972 weiterentwickelt wurde, wurde gleichzeitig mit einer Sauerstoffelektrode der aktuelle Gesamtsauerstoffverbrauch und mit einer Ionisationskammer die $^{14}CO_2$-Rate von Hexanoat gemessen. Auf diese Weise konnte der Gesamtsauerstoffverbrauch des Herzvorhofs aus der Verbrennung sowohl der exogenen als auch der endogenen Substrate gemessen und mit dem aus der $^{14}CO_2$-Rate des markierten Substrates stöchiometrisch errechneten O_2-Verbrauchs verglichen werden.

Die eigentlichen Versuchsbedingungen wie Badtemperatur, Badvolumen, Frequenz, Präparationsmethode u.a. waren identisch mit den Bedingungen der zuvor beschriebenen Versuchsserien.

Wie bereits in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben, kam es auch hier nach Zugabe von 5×10^{-5} g/ml Carbocromen zu einem positiv inotropen Effekt. Bei mit den

übrigen Versuchen vergleichbarer Ausgangsleistung kam es zu einer Zunahme der Kontraktionsleistung um 13,8% ± 3,76 ($n'=5$, $P < 0,02$). Entsprechend der Leistungszunahme kam es zu einer Zunahme des Gesamtsauerstoffverbrauchs um 9,4% ± 1,8 ($n'=5$, $p < 0,02$) und der $^{14}CO_2$-Rate aus der Verbrennung von ^{14}C-Hexanoat um 7% ± 2 ($n'=5$, $p < 0,02$)(Tab. 6).

Der Substratanteil von ^{14}C-Hexanoat an der Gesamtoxidation betrug vor und nach Carbocromenzugabe 72% bzw. 71%. Es konnte hier somit keine Verschiebung des Hexanoatanteils am Gesamtsauerstoffverbrauch gegenüber den übrigen Substratpartnern festgestellt werden. Die restlichen 28% bzw. 29% am Gesamtsauerstoffverbrauch stammen aus der Verbrennung der zugegebenen Glucose und endogener Glykogen- und Lipidanteile.

Wie in Kapitel 3.2.3.1. beschrieben, beträgt der Anteil der Glucose am errechneten Sauerstoffverbrauch der exogenen Substrate ca. 10% gegenüber dem 90-prozentigen Anteil des in einer Konzentration von 2 mM vorliegenden Hexanoats. Hieraus kann man entnehmen, daß sich der Gesamtsauerstoffverbrauch aus der Verbrennung folgender Substratanteil ergibt: ca. 70% Hexanoat, ca. 10% Glucose und ca. 20% endogene Substrate wie Glykogen und endogene Lipide.

Die Versuche dieses Kapitels wurden freundlicherweise von Herrn K. Stieler, Biotechniker, Pharmakologisches Institut ausgeführt und ausgewertet, dem ich dafür herzlich danke.

Tab. 6

	vor	nach	Prozentuale Änderung (errechnet nach t-Test für Paare) n = 5'
	5×10^{-5} g/ml Carbocromen		
Leistung $\left[\frac{p\ cm}{h}\right]$	245,4 ± 43	277,2 ± 47	+ 13,8 % ± 3,7 P<0,02
direkt gemessener O_2-Verbrauch $\left[\frac{\mu Mol}{h \cdot 100\ mg\ F.G.}\right]$	9,82 ± 0,73	10,78 ± 0,9	+ 9,4 % ± 1,8 P<0,02
$^{14}CO_2$-Rate aus ^{14}C-Hexanoat $\left[\frac{\mu Mol}{h \cdot 100\ mg\ F.G.}\right]$	0,89 ± 0,08	1,11 ± 0,3	+ 7 % ± 2 P<0,02
stöchiometrisch aus der $^{14}CO_2$-Rate errechneter O_2-Verbrauch $\left[\frac{\mu Mol}{h \cdot 100\ mg\ F.G.}\right]$	7,15 ± 0,67	7,6 ± 0,7	+ 7 % ± 2 P<0,02
Prozentanteil des stöchiometrisch errechneten O_2-Verbrauchs am Gesamtsauerstoffverbrauch	72 % ± 3	71 % ± 3	

4. Diskussion

4.1. Wirkung von Carbocromen auf die Funktion des Herzvorhofes

Bei den ersten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe über die Wirkung von Carbocromen auf den Fettsäure- und Kohlenhydratstoffwechsel fand Süßkand (1976) die negativ chronotrope Wirkung von Carbocromen an spontan schlagenden, ganzen Meerschweinchenherzvorhofpräparaten. Zusammen mit dem Frequenzrückgang war es bei diesen Versuchen zu einer Zunahme der Schlagstärke gekommen. Damals konnte keine eindeutige Zuordnung des positiv inotropen Effekts gemacht werden. Dieser konnte einmal auf einer direkten Einwirkung des Carbocromens beruhen, aber auch entweder durch eine Beeinflußung der Kraft-Frequenz-Relation wie später näher besprochen wird, oder durch eine Einwirkung entsprechend der Beobachtung die bei der "Kälteinotropie" gemacht wird, bedingt sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst der negativ chronotrope Effekt am isolierten, spontan schlagenden Herzvorhof bestätigt werden, der allerdings erst bei der hohen Konzentration von 5×10^{-5} g/ml voll ausgeprägt ist. Außer in der o.g. Arbeit konnte die Beschreibung eines negativ chronotropen Effekts in der Literatur

nicht gefunden werden. Bei Untersuchungen am Ganztier und Menschen verhielt sich das Carbocromen frequenzneutral (Hilger et al., 1968; Pipping und Schneider, 1965; Rudolph et al., 1967). Ob die beobachtete negativ chronotrope Wirkung des Carbocromens am isolierten spontan schlagenden Herzvorhof auf dem gleichen molekularen Wirkungsmechanismus wie die beobachtete direkte positiv inotrope Wirkung zurückzuführen ist, kann zunächst nicht gesagt werden. Die Wirkung auf den Schrittmacher und auf die Kontraktilität erfolgt im annähernd gleichen Konzentrationsbereich von 5×10^{-6} - 5×10^{-5} g/ml. Eine toxische Wirkung mit Arrhytmien tritt im Bereich zwischen 1×10^{-4} und 5×10^{-4} in einem weiten Konzentrationsbereich auf.

Da die beobachtete negativ chronotrope Wirkung am Ganztier nicht beobachtet wurde, sondern nur an isolierten Schrittmacherpräparaten, scheint diese Wirkung am Gesamtorganismus reflektorisch unterdrückt zu werden.

Die positiv inotrope Wirkung wurde bisher bis auf die Arbeit von Süßkand (1976) nicht beschrieben. Diese war, wie bereits erwähnt, am spontan schlagenden Herzvorhof nach Carbocromenzugabe zusammen mit einem Frequenzabfall beobachtet worden. Da die Spontanfrequenz der Meerschweinchenherzvorhöfe im in vitro Versuch bei 130 - 140 Schlägen/min beträgt und das Maximum der Kraft-Frequenz-Beziehung bei 90 - 120 Schlägen/min liegt, konnte

zunächst angenommen werden, daß die positive Inotropie auf einem Frequenzabfall beruht. Durch unsere Untersuchungen an elektrisch stimulierten Herzvorhöfen, bei welchen die Frequenz konstant gehalten werden konnte, konnte nun eindeutig die direkte positiv inotrope Wirkung von Carbocromen gezeigt werden.

Da diese Wirkung von Carbocromen bei Versuchen mit anderen Tierarten nicht nachgewiesen werden konnte, (pers. Mitteilung Nitz und Schraven) ist hier evtl. ein tierspezifisches Phänomen anzunehmen. Typisch bei fast allen Versuchen ist der zweigipflige Verlauf der Kontraktionsamplitude. Hierbei scheint der erste, bereits nach ca. 30 sec auftretende Anstieg der Kontraktionsamplitude nicht auf einer direkten Wirkung des Carbocromens an der Herzmuskulatur zu beruhen. Es ist hier vielmehr an ein physikalisches Phänomen zu denken, wobei 2 Ursachen in Betracht zu ziehen sind:

1. Von Untersuchungen mit Glucose an Herzvorhöfen mit der auch hier verwandten Badmethode ist bekannt, daß die Glucose nach Zugabe einen positiv inotropen Effekt verursacht. Diese Wirkung tritt allerdings erst ab einer Konzentration von 3 mM Glucose auf (Siess et al., 1970). Dies wird mit der osmotischen Wirkung des zugegebenen Zuckers erklärt. Da die verwendeten Carbocromenampullen Laktose als "Lösungsvermittler" enthalten, könnte es

auch hier einmal durch die Laktose selbst, zum anderen auch durch das Carbocromen zu einer osmotischen Wirkung kommen, welche einen relativ schnell einsetzenden Anstieg der Kontraktionsamplitude bewirken könnte. Allerdings sind die erreichten Konzentrationen von Carbocromen so klein, so daß eine osmotische Wirkung hier unwahrscheinlich ist. Die Frage, ob der Lösungsvermittler Laktose eine entsprechende Wirkung entfaltet, könnte mit Versuchen mit Carbocromen als Reinsubstanz beantwortet werden. Käme es bei Verwendung von Carbocromen als Reinsubstanz nicht zu diesem 1. Gipfel in der Kontraktionsamplitude, müßte eine osmotische Wirkung von Laktose als Ursache angenommen werden.

2. Eine andere Deutungsmöglichkeit liegt in der Tatsache begründet, daß Carbocromen eine gewisse Oberflächenaktivität besitzt. Diese schon bekannte Tatsache konnte auch bei unseren Versuchen beobachtet werden, da sich die Bläschengröße nach Zugabe von Carbocromen deutlich änderte. Kommt es nun durch Carbocromen zu einer Verringerung der Oberflächenaktivität, ändert sich auch der Sauerstoffpartialdruck. Hiermit kann es zu einem erhöhten O_2-Angebot kommen. Inwieweit hiermit die kurzfristige und die späteinsetzende inotrope Wirkung zu erklären ist, kann hier nicht gesagt werden. Der langsame, kontinuierliche Anstieg der Kontraktionsamplitude ist sicher auf eine

direkte positiv inotrope Wirkung des Carbocromens zurückzuführen. Auffällig ist, daß diese ähnlich wie bei den Herzglykosiden treppenförmig vor sich geht und auch im toxischen Bereich in eine Rückstandskontraktur mit gleichzeitigem Abfall der Kontraktionsamplitude übergeht.

Ob die Wirkung von Carbocromen auf einem ähnlichen Wirkungsmechanismus wie die der Herzglykoside beruht, kann aus diesen Versuchen nicht gesagt werden. Auffällig ist allerdings der ähnliche Verlauf, doch ist der Wirkungsbereich zwischen Herzglykosiden und Carbocromen um mehrere 10er Potenzen verschieden. Die beobachtete Konzentration für diese Wirkung dürfte bei der üblichen Dosierung im Gesamtorganismus am Herzen wohl kaum erreicht werden. Die Möglichkeit einer Einwirkung über die Phosphodiesterasehemmung wird später noch diskutiert.

4.2. Wirkung von Carbocromen auf den Stoffwechsel des Herzvorhofs

4.2.1. Inkubation von gut versorgten Herzvorhöfen mit wechselseitig markierter Glucose und Palmitinsäure

Um Veränderungen des Stoffwechselverhaltens durch eine Substanz möglichst exakt beurteilen zu können, wäre ein konstantes Funktionsverhalten des Herzvorhofs not-

wendig. Die durch Carbocromen hervorgerufene negativ chronotrope Wirkung ließ sich durch die Verwendung von elektrisch stimulierten linken Herzvorhöfen umgehen. Nicht auszuschalten war bei unseren Versuchen die positiv inotrope Wirkung des Carbocromens und die nach ca. 2 Stunden auftretenden Ermüdungserscheinungen des Herzvorhofs (v. Hees, 1976). Nach Ostheim und Süßkand hängt jedoch die $^{14}CO_2$-Rate von kurz- bzw. langkettigen Fettsäuren in wesentlich stärkerem Ausmaß von der Frequenz als von der Inotropie ab.

Bei der Beurteilung der Stoffwechselveränderung muß trotzdem die Änderung in der Leistung des Vorhofs unbedingt berücksichtigt werden. Bei den Vorhöfen, bei welchen die Schädigung während der Präparation möglichst gering gehalten wurde, kam es nun entsprechend dem Anstieg der Leistung zunächst mit einer Verzögerung von ca. 15 Minuten zu einem Anstieg der Verbrennung von Glucose und Palmitinsäure in gleichem Ausmaß von jeweils ca. 10%. Während nun die Verbrennung von markierter Palmitinsäure nach 1,5 Stunden auf den Ausgangswert zurückging, fiel die $^{14}CO_2$-Rate aus markierter Glucose 10% unter den Ausgangswert ab. Der Anteil der exogenen Substrate am Gesamtsauerstoffverbrauch änderte sich nach Zugabe von Carbocromen nur unwesentlich. Der Anteil von Glucose lag zwischen 62% und 59,5%, der von

Palmitinsäure zwischen 38% und 40,5%. Eine Hemmung des Eintritts von Palmitinsäure konnte also unter diesen Bedingungen bei Leistungssteigerung nicht nachgewiesen werden. Die obigen Werte korrelieren gut mit den von Süßkand 1976 gefundenen Anteilen am O_2-Verbrauch. Dabei muß berücksichtigt werden, daß bei unseren Versuchen ebenso wie bei Süßkand mit einer Badtemperatur von 30°C gearbeitet wurde. Aus Versuchen an durchströmten Rattenherzen ist bekannt (Neely et al., 1970), daß bei 37°C und bei Substratkonzentrationen von 0,5 mM Palmitinsäure und 5,5 mM Glucose, Palmitinsäure zu 70% am O_2-Verbrauch beteiligt ist, während der Anteil der Glucose nur 30% ausmacht. Der gefundene höhere Anteil von Glucose von 60% zu den 40% der Palmitinsäure könnte einmal daran liegen, daß in unseren Versuchen bei 30°C gearbeitet wurde. Bei dieser Temperatur könnte das Acyl-transferase-System nicht voll wirksam sein und so für die Verbrennung von Palmitinsäure einen begrenzenden Faktor darstellen. Für diese Annahme würde sprechen, daß die kurzkettige Fettsäure Hexanoat, die ohne das Acyl-transferase-System in die Mitochondrien eintritt, ein wesentlich höheres V_{max} hat als Palmitinsäure (Süßkand,1976). Eine 2. Ursache könnte darin liegen, daß der K_m-Wert von Glucose 10 mM ist und bei 5 mM naturgemäß eine Verschiebung zur Fettsäureoxidation anzunehmen ist, während diese bei unseren Versuchen mit 15 mM Glucose nach kinetischen Gesetzen

zurückgedrängt werden muß. Eine weitere Ursache für das unterschiedliche Verhalten in den Anteilen an der Oxidationsrate könnte noch im unterschiedlichen Stoffwechselverhalten zwischen Herzvorhof- und Ventrikelmuskulatur liegen. So fanden Süßkand et al., daß Herzvorhöfe einen wesentlich höheren Glykogengehalt besitzen als Ventrikelmuskulatur, während umgekehrt der Lipidgehalt der Herzvorhofmuskulatur gegenüber der Ventrikelmuskulatur beträchtlich geringer und der Glykogengehalt wesentlich höher ist. Dies könnte sich ebenfalls in einer unterschiedlichen Enzymaktivität bei der Oxidation dieser Substrate äußern.

Eine durch Carbocromen verursachte Verschiebung der Substratpartner, wie sie Schraven 1976 u. 1978 beschrieben hat, konnte hier bei 30°C nicht bestätigt werden. Der zunächst aufgetretene Anstieg in der Verbrennung von Glucose und Palmitinsäure ist auf den erforderlichen Mehrverbrauch an Substrat infolge der Leistungssteigerung zurückzuführen. Da der Verbrauch an exogener Glucose nach 1 1/2 Stunden trotz der gegenüber dem Ausgangswert noch höheren Leistung 10% unter dem Verbrauch vor der Carbocromenzugabe liegt, und die $^{14}CO_2$-Rate aus der Palmitinsäureverbrennung zu diesem Zeitpunkt mit dem Ausgangswert identisch ist, muß eine vermehrte Verwertung von endogenem Glykogen angenommen werden.

Hier ist vielleicht von Interesse, daß nach Untersuchungen von Siess et al. (1972) das Herzglykosid Strophantin eine zuvor durch ß-Blocker gehemmte Glykogenolyse im Verlauf der ausgeprägten positiv inotropen Wirkung nach Strophantin wieder aufhebt. Es ist also sehr wohl möglich, daß direkt oder indirekt durch die positiv inotrope Wirkung nach Carbocromen eine vermehrte Substratoxidation aus endogenen Speichern wie Glykogen oder Lipiden erfolgen kann. Untersuchungen über die Wirkung von Carbocromen auf die Glykogenolyse liegen in der Literatur bisher noch nicht vor.

4.2.2. Inkubation mit Palmitinsäure und Hexanoat

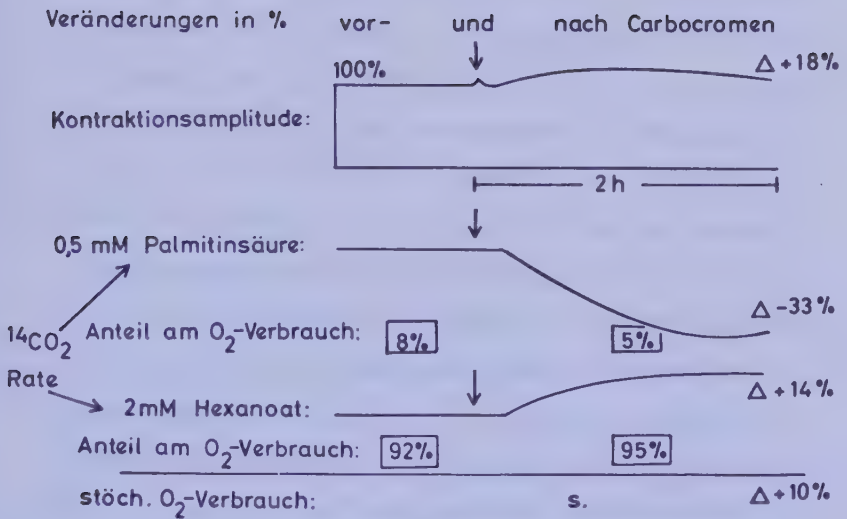
Wie sehr ein gesteigerter Energiebedarf durch eine positiv inotrope Wirkung von den kinetischen Größen der oxidierten Substrate abhängig ist, zeigen die Versuche mit der kombinierten Inkubation von Palmitinsäure und Hexanoat. Erwartunggemäß kommt es bei Inkubation mit diesen 2 Fettsäuren in den unter Kapitel 3.2.2. angegebenen Konzentrationen zu einem starken Überwiegen der kurzkettigen Fettsäure am Gesamtsauerstoffverbrauch (Ostheim, 1972). Sowohl die C-16 als auch die C-6 Säuren werden beide über CoA in die Oxidation eingeschleust. Während Hexansäure direkt in die Mitochondrien diffun-

diert, wird Palmitinsäure über das Carnitintransferase-system in die Mitochondrien eingeschleust (Bode und Klingenberg, 1965; Neely et al., 1974). Nach Untersuchungen von Siess et al. und Süßkand hat Hexanoat einen K_m-Wert von 0,46 mM mit einem V_{max} von 8,8 µMol O_2/h·100 mg FG, während Palmitinsäure trotz ähnlichem K_m-Wert von 0,34 mM nur ein V_{max} von 2,55 µMol O_2/h·100 mg FG besitzt. Bei einer Konzentration, welche dem etwa 5-fachen K_m-Wert für Hexanoat und dem 1,5-fachen K_m-Wert für Palmitinsäure entspricht, beträgt der Anteil der exogenen Substrate am Gesamtsauerstoffverbrauch für Hexanoat 91,7% und für Palmitat 8,3%, ohne Berücksichtigung des hier sicher kleinen endogenen Substratanteils. Nach Zugabe von Carbocromen kommt es zu einer Zunahme des Gesamtsauerstoffverbrauchs, wobei diese Zunahme allein aus dem Anstieg der Hexanoatverbrennung resultiert. Die Verbrennung von Palmitat fällt sogar absolut um 33% ab. Relativ nimmt der Anteil der Palmitatverbrennung am O_2-Verbrauch von 8,3% auf 5% ab. Für dieses Stoffwechselverhalten gibt es 2 Erklärungsmöglichkeiten:

1. Es besteht die Möglichkeit, daß es sich um eine Konkurrenz am Coenzym A handelt. Vor der Zugabe von Carbocromen steht jeweils eine bestimmte Menge CoA für den Transport von Palmitinsäure durch die Mitochondrien-

membran und für die Verbrennung von Hexanoat bei der ß-Oxidation bzw. im Krebszyklus zur Verfügung. Wird nun durch eine wie auch immer hervorgerufene Leistungssteigerung vermehrt Energie verbraucht, wird CoA entsprechend vermehrt für die Verbrennung von Hexanoat herangezogen. Es steht deshalb entsprechend weniger CoA für den Transport der langkettigen Fettsäure durch die Mitochondrienmembran zur Verfügung. Kurz gesagt: Da das Hexanoat bei Leistungssteigerung damit wesentlich schneller zur Verfügung steht, "nimmt es das CoA entsprechend vermehrt in Anspruch". Dadurch wird die Verbrennung von Palmitat zurückgedrängt und die Hexanoatverbrennung steigt an.

2. Eine weitere Möglichkeit liegt in einem direkten Angriffspunkt des Carbocromens in der Mitochondrienmembran. Untersuchungen von Ostrowski (1978) an Rattenherzmitochondrien deuten auf eine Beeinflussung des komplexen enzymabhängigen Transports langkettiger Fettsäuren durch die Mitochondrienmembran hin. Die verminderte Verbrennung von Palmitinsäure nach Zugabe von Carbocromen könnte man sich so z.B. durch eine Hemmung des Acyl-transferase-Systems vorstellen. Dafür sprechen nun auch die folgenden Versuche mit Hexanoat und Glucose.



Schematische Darstellung des Verhaltens von Herzvorhöfen auf Kontraktilität, Palmitinsäure- und Hexanoatoxidation und deren errechneten Anteile am O_2-Verbrauch.

4.2.3. Inkubation mit wechselseitig markierte Glucose und Hexanoat

Bei der ersten Versuchsreihe mit 2 mM Hexanoat und 15 mM Glucose kommt es trotz eindeutiger Leistungssteigerung durch Carbocromen nur zu einem Anstieg der Hexanoat-Oxidation. Die Glucoseoxidation bleibt auf gleichem Niveau. Somit kann eindeutig gezeigt werden, daß der Eintritt der kurzkettigen Fettsäuren in die Oxidation bei der Konzentration von 2 mM sicher nicht gehemmt wird. Bei Verwendung von 0,5 mM Hexanoat und 15 mM Glucose kommt es dagegen trotz Leistungssteigerung nur zu einem Anstieg der Glucoseoxidation, während die Oxidationsrate von Hexanoat um ca. 5% abfällt. Dies spricht nun wie die vorherigen Beobachtungen sehr dafür, daß Leistungssteigerungen mit folgender Erhöhung des O_2-Verbrauchs durch das Substrat bevorzugt gedeckt werden, das an Konzentration und Affinität an CoA überwiegt (Siess und Glomme, 1968; Opie et al., 1963; Shipp, 1964; Peter, 1967; Neely et al., 1970; Siess et al., 1970). Der Anteil der Glucoseoxidation am errechneten Gesamtsauerstoffverbrauch beträgt bei Zugabe von 2 mM Hexanoat 8% und bei 0,5 mM Hexanoat 15,5%. Durch die durch die Carbocromenzugabe hervorgerufene Leistungssteigerung kommt es zu einer weiteren Verschiebung: bei der Kombination mit 2 mM Hexanoat fällt der Glucoseanteil weiter auf 7,5% ab,

während es bei Inkubation mit 0,5 mM Hexanoat zu einer weiteren Steigerung der Glucoseverbrennung auf 21,5% kommt.

Bei der Inkubation der Herzvorhöfe mit Glucose und 0,5 mM Hexanoat kommt es trotz einer Leistungssteigerung um 19,5% nur zu einer Zunahme des Gesamtsauerstoffverbrauchs aus den zugeführten exogenen Substraten um 2%. Es muß deshalb angenommen werden, daß auf Grund des geringeren Hexanoatangebots vermehrt endogenes Glykogen zur Energiegewinnung herangezogen wird.

Es kommt also hier bei hoher Hexanoatkonzentration bei einer Leistungssteigerung zu einer Bevorzugung der Hexanoatoxidation, während bei der niederen Hexanoatkonzentration Glucose und Glykogen vermehrt verbrannt werden. Da Hexanoat wesentlich leichter und schneller in die Herzmuskelzelle und durch die Mitochondrienmembran tritt, steht sie bei entsprechender Konzentration im Badmedium bei einem durch die Leistungssteigerung hervorgerufenen erhöhten Energiebedarf rascher zur Verfügung und wird dementsprechend gegenüber der Glucose bevorzugt. Ist aber die Hexanoatkonzentration gering, müssen andere Substrate vermehrt zur Deckung des gesteigerten Energieverbrauchs verbrannt werden. Da die nun ersatzweise vermehrt herangezogene Glucose nicht in ausreichender Menge

und Zeit zur Deckung des gesteigerten Energiebedarfs zur Verfügung steht, wird der Glykogenpool zum Ausgleich des Defizits herangezogen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit bieten Befunde von Siess et al., 1970. Diese fanden, daß bei Inkubation mit allein 15 mM Glucose diese zu 55% am Gesamtsauerstoffverbrauch beteiligt ist, während der Rest (45%) vorwiegend aus dem Glykogen stammt, da der Lipidgehalt sehr gering ist. Bei Inkubation mit allein 2 mM Hexanoat kommt es dagegen zu einem Anteil von 80 - 90% Hexanoat und nur 10 - 20% als Glykogen am Gesamtsauerstoffverbrauch. Diese Angaben lassen sich mit unseren Versuchsergebnissen gut in Einklang bringen: Bei Inkubation mit Glucose und 2 mM Hexanoat kam es entsprechend dem Leistungsanstieg zum Anstieg des stöchiometrisch aus dem exogenen Substratverbrauch errechneten O_2-Verbrauchs in ähnlichem Umfang.

Bei Inkubation mit Glucose und 0,5 mM Hexanoat war der stöchiometrisch errechnete Sauerstoffverbrauch trotz beträchtlicher Leistungszunahme nur unwesentlich gestiegen, woraus zu schließen ist, daß hier entsprechend mehr Glykogen verbraucht wird.

Die Untersuchungen mit der direkten Sauerstoffverbrauchsmessung ermöglichte nun auch hier eine Aussage über exogenen und endogenen Substratanteil an der Oxidation. Die gefundenen Anteile am Gesamtsauerstoffver-

brauch bei Inkubation mit Glucose und 2 mM Hexanoat von ca. 70% Hexanoat, ca. 10% Glucose und ca. 20% endogener Substrate entsprechen in etwa den von Siess et al., 1970 gefundenen Werten.

Auch hier wird eine Leistungssteigerung durch positiv inotrope Wirkung mit einem Mehrverbrauch von ^{14}C-Hexanoat und einem Anstieg des gemessenen Sauerstoffverbrauchs in der gleichen Größenordnung beantwortet. Der Anstieg des direkt gemessenen O_2-Verbrauchs liegt mit 9% nicht signifikant höher als der Anstieg der $^{14}CO_2$-Rate aus der Verbrennung von ^{14}C-Hexanoat (+7%). Aus Kapitel 3.2.3.1. ist bekannt, daß die Glucoseoxidation bei Inkubation mit 2 mM Hexanoat nach Carbocromenzugabe nicht ansteigt. Ein geringer Anteil am erhöhten O_2-Verbrauch aus endogenem Substrat - vorwiegend Glykogen - kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Der Anteil des Hexanoats am Gesamtsauerstoffverbrauch bleibt damit nach Carbocromenzugabe unverändert, so daß auch hier gesagt werden kann, daß der Eintritt der kurzkettigen Fettsäure in die Oxidation bei der Konzentration von 2 mM sicher nicht gehemmt wird.

4.2.4. Inkubation von hypoxisch vorgeschädigten Herzvorhöfen mit wechselseitig markierter Glucose und Palmitinsäure

Ganz anders ist das Funktions- und Stoffwechselverhalten hypoxisch vorgeschädigter Herzvorhöfe nach Einwirkung von Carbocromen. Hier kommt es nach Inkubation zu einem kontinuierlichem Abfall der Kontraktionsamplitude, der durch Carbocromen nur kurzfristig unterbrochen wird. Die Oxidationsrate von Palmitinsäure folgt diesem Abfall in etwa gleichem Ausmaß. Im Gegensatz dazu kommt es jedoch nach Carbocromen zu einem Anstieg der Oxidationsrate von Glucose um 16%, d.h. der O_2-Verbrauch, der entsprechend der geringen Leistung bereits signifikant weit unter dem der gut schlagenden Herzvorhöfe liegt, sinkt nicht entsprechend der um 30% verringerten Leistung ab, sondern bleibt gleich. Da diese Werte allerdings nur stöchiometrisch aus exogenen Substraten ohne endogenen Anteil berechnet wurden, kann nicht gesagt werden, inwieweit hier zusätzlich noch eine zusätzliche Beteiligung am Gesamtsauerstoffverbrauch durch endogene Substrate besteht.

Durch die in Kapitel 3.2.1.2. beschriebene Vorbehandlung dieser Herzvorhöfe kann es zu einer vielfältigen Schädigung des Gewebes kommen:

1. Während einer Zeit von 20 Minuten sind diese Herzvorhofpräparate nur dem O_2-Partialdruck der Luft ausgesetzt. Dadurch kommt es zu einem ungenügenden Sauerstoffangebot mit entsprechender Schädigung von besonders hypoxieempfindlichen Zellbestandteilen. Aus den Untersuchungen der Elektrolyte und H_2O-Anteile konnte eine signifikante Na^+-Zunahme und ein Oedem in entsprechend vorbehandelten Herzvorhöfen festgestellt werden.

2. Da die Vorhöfe ca. 15 Minuten ohne Bewegung in der Präparierkammer verbleiben, kommt es an der Oberfläche dieser Präparate zu einer praktisch ruhenden Flüssigkeitsschicht ("hydrodynamische Grenzschicht", unstirred layer) (Winne, 1973; Mensing, 1977) wodurch der Diffusionsaustausch zwischen Gewebe und Badmedium stark behindert ist. Diese Diffusionsbehinderung betrifft nicht nur den O_2- sondern auch den Substrataustausch, wodurch die für die aerobe als auch die anaerobe Glykolyse benötigte Glucose nur in ungenügender Menge aufgenommen werden kann.

3. In der nicht durchperlten K-H-Lösung besteht ein pH von 8. Durch die Hypoxie kommt es nun zur Aktivierung von anaeroben Stoffwechselvorgängen, wobei durch Abbau neutraler Moleküle wie Glykogen und Glucose zu Milchsäure eine Steigerung der intrazellulären H^+-Konzentration erfolgt. Diese Acidose tritt verstärkt in der von der Hypoxie besonders

betroffenen Innenzone des Präparates auf, wodurch es gegenüber der alkalischen Lösung zu einem starken Gefälle in der H+-Konzentration kommt.

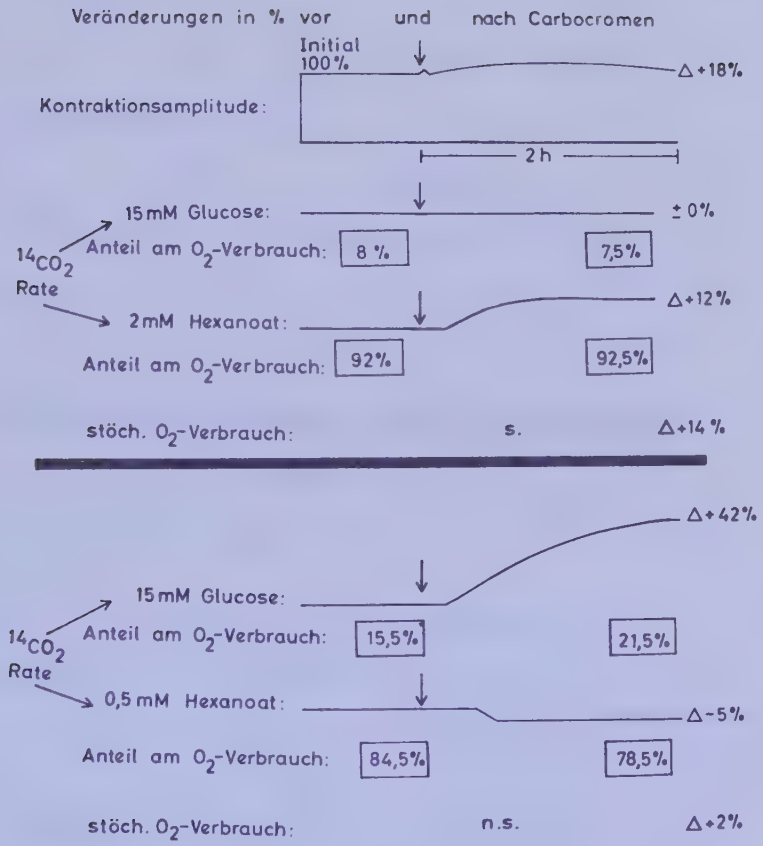
Es wäre nun möglich, daß durch Hypoxie, Substratmangel und H+-Konzentrationsgefälle (Opie, 1965) es zu einer Schädigung von Membranbestandteilen kommt, welche den aktiven Transport langkettiger Fettsäuren bewerkstelligen. Tatsächlich zeigt sich aber, daß nach Einstellung des steady state nach 2 Stunden trotz abnehmender Leistung der Palmitinsäureanteil am Sauerstoffverbrauch nicht signifikant verschieden von dessen Anteil bei den "gut versorgten Vorhöfen" ist. Fügt man nun Carbocromen zu, so zeigt sich signifikant, daß trotz des weiteren Leistungsabfalls der Palmitinsäureanteil von 34 auf 23,5% zurückgedrängt wird, d.h. um 33% absinkt, während der Glucoseanteil von 66 auf 76,5% signifikant ansteigt. Das zeigt sich besonders deutlich in einer Steigerung der Glucoseoxidation trotz abnehmender Leistung, während die Palmitinsäureoxidation wie beschrieben, entsprechend der Leistung abfällt. Wir können also in diesem Fall an den vorgeschädigten Herzvorhöfen den Befund von Schraven auch in ähnlichem quantitativen Ausmaß bestätigen. Die Untersuchungen von Schraven wurden an Herzventrikelschnitten von Ratten bei 37°C gemacht. Bei Ventrikelschnitten könnte nun tatsächlich schon

durch die mechanische Zerkleinerung und das Problem der "unstirred layer" ähnliche Verhältnisse vorliegen wie bei unseren vorgeschädigten Herzen. Es bestehen aber auch Unterschiede in der Methodik hinsichtlich der Temperatur ($30^{o}/37^{o}C$), der verwendeten Muskelart (Vorhof/Ventrikel) und Tierspezies (Meerschweinchen/Ratte). Aus unseren Versuchen kann sicher gesagt werden, daß am nicht geschädigten Herzvorhofmyokard bei $30^{o}C$, bei Leistungssteigerung durch Carbocromen eine Hemmung der Aufnahme von Palmitinsäure nicht festgestellt werden kann. Verschiebungen der Substratanteile bei gesteigertem Sauerstoffverbrauch als Folge der Leistungssteigerung richten sich ausschließlich nach Konzentration und Affinität der konkurrierenden Substratpartner aus dem Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel am CoA bei Eintritt in die Atmungskette.

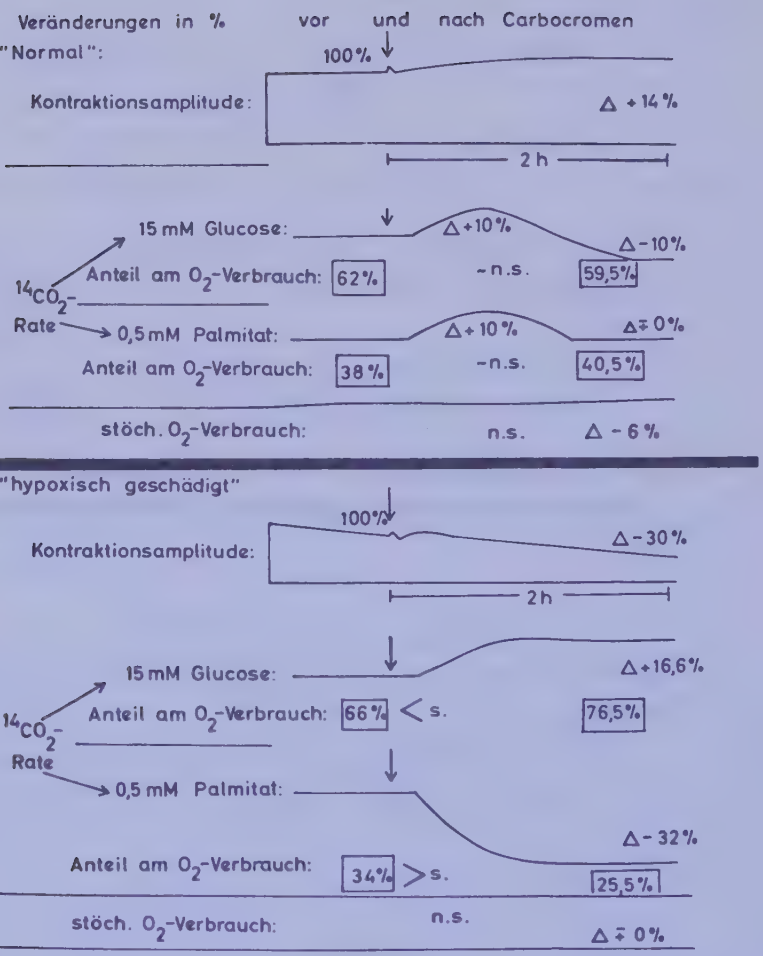
Zum molekularen Wirkungsmechanismus von Carbocromen auf Stoffwechsel und Funktion können wir aufgrund unserer Untersuchungen wenig sagen. Die positiv inotrope Wirkung bei gleichzeitiger deutlich negativ chronotroper Wirkung auf den Schrittmacher ist in der inotropen Wirkung mit Ausnahme der chronotropen Wirkung ähnlich der Herzglykosidwirkung. Gegen einen solchen Wirkungsmechanismus sprechen allerdings Untersuchungen von Nitz, Kukovetz und Pöch, die bei hohen Carbocromenkonzentrationen von 1,4 ·

10^{-3} M einen Anstieg von cycl. AMP als Folge einer Phosphodiesterasehemmung beobachtet haben. Das würde den allmählichen Anstieg der positiv inotropen Wirkung, allerdings nicht die negativ chronotrope Wirkung, erklären. Damit könnte auch eine gesteigerte Glykogenolyse erklärt werden, die allerdings auch bei Strophantin nach ß-Rezeptorenblockade beobachtet wurde, und somit mit jeder positiv inotropen Wirkung einhergehen kann. Einen weiteren Hinweis für die Wirkung von Carbocromen auf die Phosphodiesterase gibt die Untersuchung von Aporti et al., 1975, wo gefunden wurde, daß unter Carbocromen vor allem der subzelluläre und damit der für metabolische Prozesse verantwortliche Teil der PDE gehemmt wird.

Der Stoffwechseleffekt nach Carbocromen erscheint als Folge nicht als Ursache der positiven Wirkung auf die Kontraktilität. Der Leistungssteigerung folgt ein gesteigerter O_2-Verbrauch. Dasjenige Substrat wird bevorzugt, das nach Konzentration und Kinetik am besten in den Krebszyklus eingeschleust wird.



Schematische Gegenüberstellung des Verhaltens von Herzvorhöfen auf Kontraktilität, Glucose- und Hexanoatoxidation und der entsprechenden Anteile am O_2-Verbrauch, einmal bei 2 mM Hexanoat, das andere Mal bei 0,5 mM Hexanoat.



Schematische Gegenüberstellung des Verhaltens "normaler" und "hypoxisch geschädigter" Herzvorhöfe auf Kontraktilität, Glucose- und Palmitinsäureoxidation, und daraus berechnete Anteile am O_2-Verbrauch.

5. Zusammenfassung

1. Um die Frage der Wirkung von Carbocromen auf den Stoffwechsel des Herzmuskels zu prüfen, wurden Versuche mit kurz- und langkettigen Fettsäuren und Glucose an elektrisch gereizten isolierten Meerschweinchenherzvorhöfen durchgeführt. Dabei wurde außerdem der Einfluß von Carbocromen auf die Funktion des Herzvorhofs geprüft.

2. An isolierten spontan schlagenden Herzvorhöfen von Meerschweinchen kommt es ab einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-7}$ g/ml Carbocromen zu einem negativ chronotropen Effekt. Ab einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-4}$ g/ml kommt es zu toxischen Erscheinungen, vor allem in Form von Arrythmien.

3. An isolierten elektrisch stimulierten Herzvorhöfen zeigt sich nach Zugabe von $5 \cdot 10^{-5}$ g/ml Carbocromen eine positiv inotrope Wirkung. Der Verlauf der Kontraktionsamplitude ist zweigipflig, wobei der 1. kleinere und kurzfristige Gipfel bereits nach ca. 3 Minuten erreicht wird, während das 2. Maximum nach einem langsamen und kontinuierlichen Anstieg nach ca. 30 - 60 Minuten erreicht wird. Diese Zunahme der Kontraktionskraft beträgt maximal ca. 20%.

4. Bei Inkubation mit 15 mM Glucose und 0,5 mM Palmitinsäure kommt es bei nicht vorgeschädigten Herzvorhöfen nach Zugabe von Carbocromen ($5 \cdot 10^{-5}$ g/ml) zu einer Zunahme

der Leistung im Mittel um 14%. Die Verbrennung von Glucose und Palmitinsäure nimmt zunächst jeweils um ca. 10% zu. Im steady state nach 2 h liegt dann der Glucoseumsatz 10% unter dem Ausgangswert, während der Umsatz der Palmitinsäure wieder auf das Niveau des Ausgangswertes fällt. Da der errechnete Sauerstoffverbrauch trotz Leistungssteigerung nach Carbocromen nicht signifikant vom Ausgangswert unterschieden ist, wird ein vermehrter endogener Substratumsatz diskutiert. Eine Verschiebung der Anteile der exogenen Substrate am stöchiometrischen O_2-Verbrauch läßt sich durch Carbocromen hier nicht nachweisen.

5. Bei den hypoxisch vorgeschädigten Herzvorhöfen, bei denen ein vermehrter Wasser- und Na^+-Gehalt festzustellen ist, zeigt sich ein anderes Funktions- und Stoffwechselverhalten. Nach Inkubation mit 0,5 mM Palmitinsäure und 15 mM Glucose kommt es zu einem fortwährenden Abfall der Kontraktionsamplitude, der durch die Zugabe von Carbocromen nur kurzfristig unterbrochen wird. Bei einem allmählichen Leistungsabfall um ca. 38% kommt es zu einem rasch einsetzenden Rückgang der Palmitinsäureoxidation um ca. 32%, während in der Versuchsreihe mit markierter Glucose die Oxidationsrate dieses Substrats trotz eines Leistungsabfalls von hier ca. 22% um ca. 17% ansteigt. Diese Beobachtungen entsprechen Untersuchungen von Schraven (1976) an Herzschnitten von Ratten. Die Möglichkeiten

der Einwirkung von Carbocromen auf die Substratoxidation werden diskutiert.

6. Untersuchungen über die Substratkonkurrenz bei der biologischen Oxidation nach Leistungssteigerung durch Carbocromen an nicht vorgeschädigten Herzvorhöfen ergeben folgendes:

a. Bei Inkubation mit 2 mM Hexanoat (5-facher K_m-Wert) und 0,5 mM Palmitat (1,5-facher K_m-Wert) kommt es nach Zugabe von $5 \cdot 10^{-5}$ g/ml Carbocromen bei einer Leistungszunahme von 18% zu einer Verschiebung der Anteile der exogenen Substrate: Die Hexanoatverbrennung nimmt um 14% zu, während die Oxidationsrate von Palmitinsäure um 33% zurückgeht. Hierbei sinkt der Anteil der Palmitinsäure am stöchiometrischen Sauerstoffverbrauch aus den exogenen Substraten von 8% auf 5% ab, während der Anteil des Hexanoats entsprechend zunimmt. Die Ursachen mit einer evtl. Konkurrenz am CoA werden diskutiert.

b. Bei Inkubation der Herzvorhöfe mit 2 mM Hexanoat (5-facher K_m-Wert) und 15 mM Glucose (1,5-facher K_m-Wert) läßt sich ein Verhältnis von 92% Hexanoat und 8% Glucose feststellen. Bei Zugabe von Carbocromen verschiebt sich das Verhältnis gering zu Gunsten des Hexanoats, das bei der auftretenden Leistungssteigerung den Energiemehrbedarf durch Erhöhung der $^{14}CO_2$-Rate um 12% deckt.

c. Bei Inkubation mit der niedrigeren Hexanoatkonzentra-

tion von 0,5 mM und 15 mM Glucose beträgt das Verhältnis von Hexanoat : Glucose 84,5% : 15,5%. Dieses verschiebt sich nach Zugabe von $5 \cdot 10^{-5}$ g/ml Carbocromen mit 78,5 : 21,5 zu Gunsten der Glucose, deren geringe $^{14}CO_2$-Rate um 42% ansteigt, während die höhere von Hexanoat um 5% absinkt. Da der aus der Verbrennung der exogenen Substrate errechnete Gesamtsauerstoffverbrauch nicht in gleichem Ausmaß wie die Leistung zunimmt, wird zusätzlich eine vermehrte Glykogenutilisation nach Carbocromen diskutiert.

7. Mit der Methode der direkten Sauerstoffverbrauchsmessung mit gleichzeitiger Registrierung der $^{14}CO_2$-Rate aus der Verbrennung von ^{14}C-Hexanoat läßt sich der Anteil der endogenen und exogenen Substrate annähernd bestimmen. Hierbei ergibt sich ein Anteil von ca. 70% Hexanoat, ca. 10% Glucose als exogene und ca. 20% endogene Substrate am Gesamtsauerstoffverbrauch. Nach Zugabe von Carbocromen kommt es entsprechend der Leistungszunahme zu einem Anstieg des gemessenen Sauerstoffverbrauchs und der $^{14}CO_2$-Rate aus der Verbrennung von ^{14}C-Hexanoat. Eine wesentliche Verschiebung der Substratanteile am O_2-Verbrauch läßt sich dabei nicht feststellen.

Literaturverzeichnis

Aporti, F.; Leon, A.; Toffano, G.:
Anti-Phosphodiesterase activity of the coronary dilating agent hydrochloride Carbocromene.
Pharmacol. Res. Comm. 7, 289 - 297 (1975)

Ballard, F.B.; Danforth, W.H.; Naegle, S.; Bing, R.J.:
Myocardial Metabolism of Fatty Acids.
J. clin. Invest. 39, 717 - 723 (1960)

Bing, R.J.:
Cardiac Metabolism
Physiol. Rev. 45, II, 171 (1965)

Bing, R.J.:
Herzstoffwechsel
Das Medizinische Prisma 5/67 (1967)

Bing, R.J.; Siegel, A.; Ungar, J.; Gilbert, M.:
Metabolism of the human heart. II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism.
Amer. J. Med. 16, 504 (1954)

Bing, R.J.; Bender, S.R.; Dunn, M.J.; Fry, G.A.; Fuller, W.M.; Liu, S.C.K.; Miller, H.S.; Moses, J.W.; Ritzmann, L.W.; Segal, J.P.; Shugoll, G.J.; Tillmanns, H.; Wallace, A.:
Antianginal effects of chromonar
Clin. Pharmacol. Ther. 16, 4 - 13 (1974)

Bode, C.; Klingenberg, M.:
Die Veratmung von Fettsäuren in isolierten Mitochondrien.
Biochem. Zeitschr. 341, 271 - 299 (1965)

Bretschneider, H.J.; Eberlein, H.J.; Kabus, H.M.; Nelle, G.; Reichmann, W.:
Die Wirkung von Carbocromen, einer selektiv coronarerweiternden Substanz, auf Kreislauf, Atmung und Stoffwechsel.
Arzneimittel-Forsch. 13, 255 - (1963)

Crass, M.F.; McCaskill, E.S.; Shipp, J.C.:
Effect of pressure development on glucose and palmitate metabolisme in perfused heart.
Amer. J. Physiol. 216, 1569 - 1576 (1969)

Crass, M.F.; McCaskill, E.S.; Shipp, J.C.; Murthy, V.K.:
Metabolism of endogenous lipids in cardiac muscle: effect of pressure development.
Amer. J. Physiol. 220, 428 - 435)1971)

Evans, J.R.:
Cellular Transport of Long Chain Fatty Acids.
Canad. J. Biochem., 42, 955 - 969 (1964)

Evans, J.R.; Opie, L.H.; Shipp, J.C.:
Metabolism of palmitic acid in perfused rat heart.
Amer. J. Physiol., 205, 766 - 770 (1963)

v. Hees, U.:
Elektrolyt- und Funktionsänderungen von isolierten Meerschweinchenherzvorhöfen nach Einwirkung von Isoprenalin.
Diplomarbeit für das Fach Biologie, Tübingen, 1976

Heistracher, P.; Kraupp, O.; Spring, G.:
Vergleichende Untersuchung der Wirkung einiger neuer Coronardilatatoren auf die AV - O_2 - Differenz des Hundeherzens in situ.
Arzneimittel-Forsch. 14. 1098 - 1101 (1964)

Hilger, H.H.:
Coronary flow under the influence of coronary dilators in man.
In: Coronary Heart Disease, Hrsg. von M. Kaltenbach, P. Lichtlen.
Stuttgart: Thieme 1971, S. 190

Hilger, H.H.; Behrenbeck, D.W.; Hellwig, H.; Wagner, J.:
Untersuchungen über den Einfluß koronargefäßerweiternder Pharmaka auf die Koronardurchblutung beim Menschen.
Pharmacol. Clin. 1, 77 - 86 (1968)

Keller, H.-J.:
Die gleichzeitige und kontinuierliche Messung von Kontraktionsleistung, Frequenz, Decarboxylierungsrate ^{14}C-markierter Substrate und Sauerstoffverbrauch isolierter, spontanschlagender Meerschweinchenherzvorhöfe als Methode zur Prüfung herzwirksamer Pharmaka.
Dissertation. Med. Fakultät, Marburg, 1970

Keul, J.; Doll, E.; Steim, H.; Fleer, U.; Reindell, H.:
Über den Stoffwechsel des menschlichen Herzens.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 282, 43 - 53 (1965)

Keul, J.; Doll, E.; Steim, H.; Homburger, H.; Kern, H.; Reindell, H.:
Über den Stoffwechsel des menschlichen Herzens
Pflüger Arch. ges. Physiol. 282, 1 - 27 (1965)

Keul, J.; Doll, E.; Steim, H.; Homburger, H.; Kern, H.; Reindell, H.:
Über den Stoffwechsel des Herzens bei Hochleistungssportlern.
Z. Kreisl. - Forsch. 55, 2, 190 - 215 (1965)

Kochsiek, K.; Bretschneider, H.J.; Scheler, F.:
Vergleichende experimentelle Untersuchungen über die coronargefäßerweiternde Wirkung von Phenyl-propyl-diphenyl-propyl-amin.
Arzneimittel-Forsch. 10, 576 - 583 (1960)

Krebs, H.A.; Henseleit, K.:
Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper.
Hoppe - Seylers Z. physiol. Chem. 210, 33 - 66 (1932)

Kukovetz, W.R.; Pöch, G.:
The positive Inotropic Effect of Cyclic AMP.
Adv. Cyclic Nucleotide Res., 1, 261 - 290 (1972)

Lochner, W.; Hirche, H.J.:
Untersuchungen mit 3-(ß-Diäthyl-amino.äthyl)-4-methyl-7-carbäthoxy-2-oxo-(1,2-chromen), einer neuen coronargefäßerweiternden Substanz.
Arzneimittel-Forsch. 13, 251 - 255 (1963)

Mensing, H.J.:
An improved method for continuous recording of various contraction parameters, decarboxylation rate of a ^{14}C-marked substrate, and oxygen consumption of isolated heart atria preparations.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 282, R64 (1974)

Mensing, H.J.:
Die Badmethode für isolierte Muskelpräparate. Beiträge zu ihrer Geschichte und zur Weiterentwicklung für Untersuchungen am Herzmuskel.
Dissertation, Medizinische Fakultät, Tübingen 1977.

Mjos. O.D.; Bugge-Asperheim, B.; Kirl, F.:
Factors determining myocardial oxygen consumption (MVO_2) during elevation of aortic blood pressure.
2. Relation between MVO_2 and free fatty acids.
Cardiovasc. Res. 6, 23 - 35 (1972)

Möllmann, H.; Schraven, E.; Alfes, H.; Nitz, R.E.:
Die ultrastrukturelle Verteilung von ^{14}C- und ^{3}H-markierter Carbocromen im Herzen.
Arzneimittel-Forsch. 22, 487 - 492 (1972

Müller-Sydlitz, P.M.; Hauer, G.; Dietze, G.; Baubkus, H.; Zeitlmann, F.; Gadomski, M.; Rudolph, W.:
Untersuchungen über die Substratversorgung des menschlichen Herzens.
Mat. Med. Nordmark 22, 271 - 276 (1970)

Neely, J.R.; Morgan, H.E.:
Relationship between Carbohydrate and Lipid Metabolism and the energy balance of heart muscle.
Rev. Physiol. 36, 413 - 459 (1974)

Neely, J.R.; Whitfield, C.F.; Morgan, H.E.:
Regulation of Glykogenolysis in hearts: effects in pressure development, glucose and FFA.
Amer. J. Physiol. 219, 1083 - 1088 (1970)

Neely, J.R.; Withmer, K.M.; Mochizuki, S.:
Effects of mechanical activity and hormones on myocardial Glucose and Fatty Acid Utilization.
Circ. Res. Supp 1, Vol 38 I 23 - I 30 (1976)

Nitz, R.E.; Pötzsch, E.:
3-(beta-Diäthylamino-äthyl)-4-methyl-7-carbäthoxy-2-oxo-(1,2-chromen), ein Präparat mit spez. und langanhaltender coronargefäßerweiternder Wirkung.
Arzneimittel-Forsch. 13, 243 - 250 (1963)

Nitz, R.E.; Resag, K.:
Die Wirkung von Intensain beim akuten experimentellen Herzinfarkt.
4. Conferentia Hungarica pro therapia et investigatione in pharmacologia 3. - 8.10.66, pp 173 - 176, Budapest 1968

Olson, R.E.; Piatnek, D.A.:
Conservation of energy in Cardiac Muscle
Ann. N.Y. Acad. Sci. 72, 466 - 472 (1959)

Opie, L.H.:
Effect of extracellular pH on function and metabolism of isolated perfude rat heart.
Amer. J. Physiol. 209, 1075 - 1080, (1965)

Opie, L.H.; Evans, J.R.; Shipp, J.C.:
Effect of fasting on glucose and palmitate metabolism of perfused rat heart.
Amer. J. Physiol. 205, 1203 - 1208 (1963)

Ostheim, B.D.:
Kinetik der Oxydation kurzkettiger Fettsäuren im Herzmuskel und ihre wechselseitige Konkurrenz mit dem Kohlenhydratstoffwechsel.
Dissertation, Medizinische Fakultät, Marburg 1972

Ostrowski, J.:
Wirkung von Carbocromen auf die Atmungsfunktion von Rattenherzmitochondrien.
Zur Publikation in Arzneimittel-Forsch, am 17:1.1978 bestätigt

Peter, U.:
Leistung und Glucosedecarboxylierung isolierter Meerschweinchenherzvorhöfe nach Einwirkung von Pharmaka unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen.
Dissertation, Medizinische Fakultät, Marburg 1967

Pipping, L.; Schneider, K.W.:
Die Wirkung von 3-(ß-Diäthylamino-äthyl)-4-methyl-7-carbäthoxy-methoxy-2-oxo-(1,2-chromen)hydrochlorid und Nitroglycerin auf die Herz-Kreislaufdynamik beim Herzgesunden und beim Coronarkranken.
Arzneimittel-Forsch. 15, 1008 - 1019 (1965)

Pöch, G.; Kukovetz, W.R.:
Studies on the possible Role of cyclic AMP in Drug-Induced Coronary vasodilation.
Adv. Cyclic Nucleotide Res., 1, 195 - 211 (1972)

v. Rossum, J.M.:
Cumulative Dose-Response Curves
Arch. int. Pharmacodyn 143, 3 - 4 , 299 - 330 (1963)

Rudolph, W.; Meixner, L.; Künzig, H.J.:
Untersuchungen mit 3-(ß-Diäthylamino-äthyl)-4-methyl-7-carbäthoxy-methoxy-2-oxo-(1,2-chromen)-hydrochlorid
Klin. Wschr. 45, 333 - 353 (1967)

Schneider, P.:
Aufnahmekinetik, Konkurrenz und Nutzeffekt ^{14}C-markierter Substrate des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels im Herzmuskel vor und nach Einwirkung von Adrenalin.
Dissertation, Medizinische Fakultät, Marburg 1970

Schneider, P.; Ostheim, B; Siess, M.:
Kinetics of oxidation rates and mutual competition of short chainy ^{14}C- fatty acids and carbohydrates in heart muscle cells.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.
Suppl. 274, R 99 (1972)

Schraven, E.:

Regulation des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels des Herzens durch Carbocromen.

Arzneimittel-Forsch. 26, 197 - 200 (1976)

Schraven, E.:

Influence of Carbocromene on free fatty acid metabolism of the heart.

Adv. Cardiac. Stru. and Metab. 11, 363 - 367 (1978)

Schraven, E.; Nitz, R.E.:

Die Wirkung des Coronardilatators Carbocromen auf den 3',5'-AMP-Stoffwechsel.

Arzneimittel-Forsch. 18, 396 - 398 (1968)

Schraven, E.; Trottnow, D.; Fiedler, V.B.:

Wirkung von Carbocromen auf cyclisches Adenosinmonophosphat im Herzen.

Arzneimittel-Forsch. 26, 200 - 204 (1976)

Schvacabaja, J.K. Mjasnikov, L.A.; Metelica, V.J.; Grigorjanc, R.H.:

Ergebnisse der klinischen Prüfung von Carbocromen bei chronischer Coronarinsuffizienz.

Arzneimittel-Forsch. 20, 449 - 451 (1970)

Siess, M.:

Direct and indirect pharmacological effects on the decarboxylation rate of ^{14}C-Glucose and ^{14}C-fatty acids in isolated atria of guinea pigs.

in Glasson-Waser: The use of Radioactive Isotopes in Pharmacology p 357 - 374. J. Wiley and Sons, Lt., Chichester, England (1969)

Siess, M.:

Influence on the efficiency of cardiac work.

Basis Res. Cardiol., 72, 299 - 305 (1977)

Siess, M.; Glomme, H.E.:
Die Decarboxylierungsgeschwindigkeit von ^{14}C-Glukose und ^{14}C-Hexanoat im isolierten Meerschweinchenherzvorhof in Abhängigkeit von der extrazellulären Substratkonzentration, ihrer Konkurrenz, sowie der direkten Einwirkung von Pharmaka.
Arzneimittel-Forsch. 18, 1357 - 1368 (1968)

Siess, M.; Müller, K.; Peter, U.:
Die kontinuierliche Messung der Decarboxylierungsgeschwindigkeit ^{14}C-markierter Substrate des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels in isolierten Meerschweinchenherzvorhöfen unter gleichzeitiger Bestimmung der Kontraktionsleistung als Methode zur Prüfung herzwirksamer Agentien.
Arzneimittel-Forsch. 18, 1245 - 1255 (1968)

Siess, M.; Mensing, H.J.; Kastner, F.:
Cardiodepressive and Sympathicolytic Effects of D- and L-Forms of ß-Receptor Blocking agents on Performance O_2-Consumption and substrate oxidation in antagonism to g-strophantin.
in: Les Surcharges Cardiaques, publié sous la direction de Pierre Yves Hatt, Colloque Inserm, Paris 1972

Siess, M.; Mensing, H.J.; Stieler, K.:
Investigations about the determinants of the myocardial oxygen consumption.
2. Congress of the Hungarian Pharmacological Society
Symposium on the heart muscle (1974)
Ed. by Szekeres and Papp G.Y.

Siess, M.; Kastner, F.; Schneider, P.; Stieler, K.:
Changes of the oxygen consumption in the heart muscle cell related to the heart rate and contraction force.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.
Suppl. 282, R 93 (1974)

Siess, M.; Keller, H.J.; Schare, E.; Geissler, J.; Müller, G.:
The continous and simultaneous measurement of O_2-Consumption, Rate of Decarboxylation of ^{14}C-Substrates and the Performance

of spontaneously-beating Isolated Atria of Guinea Pigs.
J. Mol. Cell. Cardiology 1, 261 - 289 (1970)

Shipp, J.C.:
Interrelation between Carbohydrate and Fatty Acid Metabolism of Isolated Perfused Rat Heart.
Metabolism, 13, 9, 852 - 867 (1964)

Stumpf, P.K.:
Metabolism of Fatty Acids.
Ann. Rev. Biochem., 38, 159 (1965)

Süßkand, K.:
Stoffwechsel und Funktion des Herzmuskels unter langkettigen Fettsäuren.
Dissertation, Naturwiss. Fakultät, Tübingen (1976)

Süßkand, K.; Meessen, H.; Schuier, F.J.; Siess, M.:
Comparison of Morphological and Biochemical Findings in the Atrial and Ventricular Muscle of Guinea Pigs, after Reserpine Treatment, after Starvation, and in Control Animals.
Virchows Arch. B. Cell Path. 26, 73 - 92 (1977)

Winne, D.:
Zur Auswertung von Versuchsergebnissen: Die verteilungsfreien Rangteste von Wilcoxon.
Arzneimittel-Forsch. 14, 119 - 121 (1964)

Winne, D.:
Zur Auswertung von Versuchsergebnissen.
Arzneimittel-Forsch. 17, 93 - 97 (1967)

Winne, D.:
Unstirred layer, source of biased Michaelis constant in membrane transport.
Biochem. Biophys. Acta 298, 27 - 31 (1973)

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. M. Siess, Direktor des Pharmakologischen Institutes der Universität Tübingen durchgeführt.
Ich danke Herrn Professor Dr. med. M. Siess für die Überlassung des Themas und für die Betreuung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Versuche.

Für die Einweisung in die Methoden und die unermüdliche Hilfe bei der Durchführung der Versuche und der Ausgestaltung der Arbeit danke ich besonders Herrn Dr. rer. nat. K. Süßkand.

Lebenslauf

Am 4. 6. 1947 wurde ich, Josef Reinhard Sauter, als Sohn des Reinhard Sauter und seiner Ehefrau Maria, geb. Sauter in Meckenbeuren, Bodenseekreis, geboren. Von April 1954 bis April 1958 besuchte ich die Volksschule in Meckenbeuren und anschließend das Neue Gymnasium in Ravensburg. Hier legte ich im Oktober 1966 die Reifeprüfung ab.

Ab WS 67/68 studierte ich Medizin an der Universität Hohenheim, wo ich im Juli 1968 die Naturwissenschaftliche Vorprüfung bestand. Ab WS 68/69 studierte ich an der Universität Tübingen, wo ich am 6. 10. 1970 die Ärztliche Vorprüfung und am 26. 7. 1974 das Medizinische Staatsexamen ablegte.

Nach meiner Tätigkeit als Medizinalassistent von Januar bis Februar 1975 an der HNO-Klinik in Tübingen, von März bis August 1975 an der Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Friedrichshafen und von November 1975 bis März 1976 an der Chir. Abteilung des KKH Tuttlingen, war ich bis April 1977 als Assistenzarzt an der letztgenannten Stelle tätig.

Im Mai 1977 begann ich mit dem experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit am Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen bei Herrn Prof. Dr. med. M. Siess.